

**Der Einfluss des Polyaminstoffwechsels auf die Funktion und Apoptose des post-
ischämischen Rattenherzes**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mörlein, Christian Ludwig
aus Herdecke

Gießen 2010

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität
Giessen

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: PD Dr. Bauer

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Tikkanen

Prüfungsmitglied: Prof. Dr. Kruse

Tag der Disputation: 17. Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	-1-
Einheiten	-3-
1 EINLEITUNG	-4-
1.1 Zelluläre Ursachen der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion	-4-
1.1.1 Zellschädigung durch Ischämie	-4-
1.1.2 Apoptose	-6-
1.1.3 Hypertrophiemarker ANF	-10-
1.1.4 Rolle der ODC	-11-
1.2 Aufgabenstellung	-13-
2 MATERIAL	-14-
2.1 Chemikalien	-14-
2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien	-14-

2.1.2 Spezielle Chemikalien	-14-
2.1.2.1 Reverse Transkription	-15-
2.1.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	-15-
2.1.2.3 Weitere Chemikalien	-16-
2.2 Geräte und Laborbedarf	-17-
2.2.1 Langendorff-Perfusionsanlage	-17-
2.2.2 PCR	-17-
2.2.3 Sonstige Geräte	-18-
2.3 Auswertung	-18-
3 METHODEN	-19-
3.1 Langendorff-Perfusion	-19-
3.1.1 Grundlagen der Perfusion isolierter Rattenherzen	-19-
3.1.2 Aufbau der Langendorff-Anlage	-20-
3.1.3 Versuchstiere	-21-

3.1.4 Präparation der isolierten Herzen	-22-
3.1.5 Versuchsdurchführung	-22-
3.1.6 Erfassung physiologischer Parameter	-23-
3.1.7 Versuchsprotokolle	-25-
3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	-26-
3.2.1 Präparative RNA-Isolierung	-26-
3.2.2 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes	-27-
3.2.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	-28-
3.3 Quantitative PCR	-29-
3.3.1 Erstellen der Standardkurve	-31-
3.3.2 Auswahl des Housekeeping Gens	-32-
3.3.3 Reaktionsbedingungen	-32-
3.3.4 Auswertung der Realtime PCR	-33-
3.4 Statistik	-35-

4 ERGEBNISSE	-36-
4.1 Auswirkungen von Aktivierung und Inhibierung der ODC auf das post-ischämische Myokard	-36-
4.2 Auswirkung von Aktivierung und Inhibierung der ODC auf die Expression hypertrophie- und apoptose-assoziiierter Gene des linken Ventrikels	-39-
4.3 Auswirkung von Aktivierung und Inhibierung der ODC auf die Expression hypertrophie- und apoptose-assoziiierter Gene des rechten Ventrikels	-43-
5 DISKUSSION	-47-
5.1 Hauptkenntnisse	-47-
5.2 Effekte der ODC auf das post-ischämische Recovery	-48-
5.3 Effekt der ODC auf Hypertrophie	-49-
5.4 Effekt der ODC auf Apoptose	-50-
5.5 Unterschiede zwischen rechtem und linkem Ventrikel	-51-
5.6 Schlussfolgerungen	-52-
6 ZUSAMMENFASSUNG	-53-

7 SUMMARY	-55-
------------------	-------------

8 LITERATURVERZEICHNIS	-57-
-------------------------------	-------------

9 Erklärung	-64-
--------------------	-------------

10 Danksagung	-65-
----------------------	-------------

11 Lebenslauf	-66-
----------------------	-------------

12 Abstracts	-68-
---------------------	-------------

Verzeichnis der Abkürzungen

ANF	Atriales Natriuretisches Peptid/Faktor
a.b.	aqua bidestillata
BAX	B-cell-lymphoma 2-associated X protein
BCEFC	2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell-lymphoma extra long
BNP	Brain Natriuretic Peptide
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
DFMO	Difluoromethylornithin
DTT	Dithiothreitol
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
iso	Isoprenalin
i.v.	intravenös
LVDP	left ventricular developed pressure
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
ODC	Ornithinedecarboxylase
Oligo-dT(15)	Oligo-desoxy-Thymidin (15 Nukleotide)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RPP	rate pressure product = LVDP *Herzfrequenz
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	real time PCR
SBFI	Natrium-bindendes Benzofuran-Isophthalat

Verzeichnis der Abkürzungen

Taq

Thermus aquaticus

Einheiten

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
IU	Internationale Einheit
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
nM	nanomolar
pg	Pikogramm
U/min	Umdrehungen pro Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Zelluläre Ursachen der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion

1.1.1 Zellschädigung durch Ischämie

Eine Ischämie oder ein Fehlen von Blutfluss beschreibt eine Minderversorgung einer Zelle, eines Zellverbandes oder eines Organs mit essentiellen Stoffen wie Sauerstoff. In Folge dessen kommt es zu einer Veränderung des intrazellulären Metabolismus. Es kann konsekutiv zu einem Untergang (Nekrose) der zu versorgenden Strukturen kommen. Bezogen auf ein Organ spricht man von Infarkt wie z.B. Herzinfarkt.

Des weiteren ist bei einer Ischämie die Dauer der Unterversorgung zu berücksichtigen, weshalb man eine vorübergehende oder passagere von einer dauerhaften oder kritischen Ischämie differenziert. Bei einer passageren Ischämie treten definitionsgemäß keine Folgeschäden für den entsprechenden Zellverband ein, wohingegen eine dauerhafte Zellschädigung bei einer kritischen Ischämie zu verzeichnen ist.

Die Ursachen einer Ischämie sind multifaktoriell, jedoch in der Mehrzahl der Fälle eine veränderte Morphologie der Blutgefäße im Sinne einer Stenose (z.B. Arteriosklerose, Arterielle Verschlusskrankheit, Raynaud-Syndrom oder als physiologische Antwort der Gefäße auf einen Kreislaufchock in Folge einer nervalen und hormonellen Kreislaufzentralisation). Außerdem kann es in Folge einer Embolie, Thrombose oder einer Dissektion eines Gefäßes zu einem Verschluss kommen.

Als sog. Ischämiezeit ist diejenige Zeitdauer festgelegt in der kein Gewebsschaden auftritt und liegt somit im Toleranzbereich des entsprechenden Gewebes. Die Toleranz einer Ischämie ist in den jeweiligen Organen verschieden und hängt von den Rahmenbedingungen ab. So ist die Ischämiezeit für das Gehirn nur wenige Minuten, wohingegen transplantierbare Organe wie z.B. das Herz in Kühlung sowie in Nährlösung einige Stunden tolerieren. Daher wird das isolierte

Rattenherz ebenfalls in einer 4°C kalten physiologischen Kochsalzlösung gekühlt, um es von dem umliegenden Pulmonalgewebe zu befreien bevor es an die Langendorff-Anlage angehängt wird (siehe Methoden 3.1.4).

In den westlichen Industriestaaten gehören kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen und sind für annähernd die Hälfte aller Todesfälle verantwortlich (Simoons et al., 2010). So hat der Herzinfarkt in Deutschland jährlich eine Inzidenz von ca. 300/100000 (Herold, 2007). Man bezeichnet diese Ischämie auch als Koronarinsuffizienz, der ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffzufuhr einerseits und Sauerstoffbedarf andererseits zu Grunde liegt. Insbesondere die endokardial betroffenen Abschnitte sind aufgrund der hohen Kompression transmuskulär verlaufender Widerstandsgefäße in Mitleidenschaft gezogen. Ein koronarer Verschluss, welcher einem Myokardinfarkt vorausgeht, ist der entscheidende Mechanismus, der zu einer Verringerung der Überlebenswahrscheinlichkeit führt (Garcia-Dorado, 2004).

Die Wiederherstellung des Blutflusses ist die erfolgsversprechendste Maßnahme, die zum Überleben der Zellen führt und somit eine bessere Funktionserholung gewährleistet. Es kommt konsekutiv zu einem komplexen Ablauf mit u.a. Fibrosierungen, hypertrophem Wachstum und Apoptose, welcher unter dem Begriff des kardialen Remodeling zusammengefasst wird (Eefting et al., 2004). Des weiteren tritt trotz Reperfusion, die den überlebenden Zellen einen Neustart ihrer Kontraktion erlaubt, ein erneuter Stress des Herzens auf: Dieser ist als sog. Reperfusionsschaden bekannt. Der Sauerstoffmangel und die daraus resultierende Verarmung von ATP führt zu einem Anstieg von Hypoxanthin, welches zu Xanthin oxidiert werden kann (Nuutinen et al., 1982). Bei dieser Umwandlung entstehen freie Sauerstoffradikale wie z.B. Superoxid oder Wasserstoffperoxid, welche durch Lipidperoxidation Zellmembranen schädigen. Es kommt zur Freisetzung zellschädigender Granula, die mit den Sauerstoffradikalen zu einer weiteren Gewebeschädigung bzw. Endothelschädigung führen, was sich in einer erhöhten Durchlässigkeit und einem Ödem bemerkbar macht (Oliveira et al., 2001). Durch den steigenden Gewebedruck und die Vergrößerung der Strömungsstrecke durch das Gewebe, kommt es zu einer Verschlechterung des Perfusionsflusses im unterversorgten, azidotischen Gewebe. Bei einer Reperfusion und folglich verbesserten Sauerstoffsituation für oxidative Reaktionen, beginnt die Umwandlung von Hypoxanthin zu Xanthin, wodurch massiv weitere Sauerstoffradikale gebildet werden, die das Gewebe weiter schädigen.

Im ungünstigen Fall kommt es zu einer Nekrose im Infarktareal mit charakteristischen Ischämieschäden auf molekularer und zellulärer Ebene. Der veränderte Stoffwechsel der Kardiomyozyten lässt sich an der Hochregulation proapoptotischer Gene messen.

Das Modell der Langendorff-Anlage stellt im Labor die Situation des Infarktes ex vivo nach. In vivo kommt es zu einem Sistieren des Blutflusses, was an der Langendorff-Apparatur in einer Unterbrechung der Perfusatzufuhr stattfindet. Mit der anschließenden PCR lassen sich die Veränderungen auf molekularer Ebene nachvollziehen.

Unter einer Ischämie an Kardiomyozyten kommt es zu charakteristischen Veränderungen innerhalb der Zelle, in der die zunehmende Energieverarmung, also der Mangel an ATP von entscheidender Bedeutung ist. Das Absinken der ATP Konzentration wird bis zu einer gewissen Schwelle toleriert. Unterhalb dieser Schwelle kommt es zu einer Ca^{2+} unabhängigen Kontraktur der Kardiomyozyten, die auch als „Rigor-Kontraktur“ bezeichnet wird. Zugrunde liegende Mechanismen beruhen darauf, dass ein anfängliches Zustandekommen von Rigor-Querkomplexen an einem Aktinfilament den Weg für weitere Myosinbindungen an weiteren Bindungsstellen bahnt. Dies führt dazu, dass die verbleibende geringe Menge an ATP an diesen Bindungsstellen zu Querbrückenzyklen und somit zu einer Kontraktur führt. Ferner wird durch oben beschriebene Kontraktur die Myosin-ATPase aktiviert, wodurch es zu einem raschen Verbrauch des restlichen ATPs kommt. Konsekutiv ist eine vollständige Deenergetisierung der Zelle zu konstatieren (Bowers et al., 1992).

Weitere ischämiebedingte Veränderungen beziehen sich auf die zunehmende oder die sich umkehrenden Ionenverhältnisse (Owens et al., 1996).

1.1.2 Apoptose

Im Rahmen pathophysiologischer Vorgänge kommen Zelltod, Proliferation und Hypertrophie eine zentrale Rolle zu. Man differenziert beim Zelltod zwei verschiedene Formen: Einerseits den unkoordinierten Zelltod (Nekrose) und andererseits den kontrollierten Zelltod (Apoptose).

Anders als bei der Apoptose, die im Zellstoffwechsel physiologisch ist und von der Zelle aktiv durchgeführt wird, kommt es bei der Nekrose zu einem passiven Sterbeprozess der Zelle, der zu einer (lokalen) Entzündung führt. Auslösende Faktoren einer Nekrose können exogener Natur sein, wie z.B. Noxen durch Bakteriengifte, plötzlicher Sauerstoffmangel (Hypo-/Anoxie), mechanische Faktoren, Hitze oder Kälte, chemische Noxen wie Laugen oder Säuren sowie die in dieser Arbeit untersuchten Ischämiebedingungen an Kardiomyozyten (Kajstura et al., 1996). Es kommt konsekutiv zu einer Ruptur der Plasmamembran, die entweder direkt durch das exogene Agens geschädigt wird oder indirekt durch Dekompensation der Ionenhomöostase, die die Zelle schwellen und platzen lässt. Durch die zunehmende Deenergetisierung und dem sich daraus ergebenden Mangel an ATP kann die Zelle, wie im vorigen Abschnitt beschrieben (1.1.1 Zellschädigung durch Ischämie) z.B. die ATP abhängige Na^+/K^+ -ATPase nicht mehr betreiben, wodurch es zum Einstrom von Na^+ und Wasser kommt und dadurch die Plasmamembran dem onkotischen Druck nicht mehr standhält. In Folge dessen gelangen Zytoplasma, lysosomale Enzyme und andere intrazelluläre Produkte ins umliegende Gewebe und den Blutkreislauf. Hieraus ergibt sich die anschließende Entzündung des umliegenden Gewebes mit etwaigem weiteren Zelluntergang. Außerdem ist es möglich einzelne intrazellulären Bestandteile wie z.B. charakteristische Herzenzyme unmittelbar nach einem Infarktgeschehen im Blut nachzuweisen (Herold, 2007).

Wie eingangs erwähnt, steht die Apoptose, also der programmierte/koordinierte Zelltod, der Nekrose in gegenteiligen morphologischen und dynamischen Prozessen gegenüber. Obwohl hierbei die genaue Rolle von Polyaminen komplex und noch nicht voll verstanden ist, scheinen sehr hohe wie auch niedrige Spiegel von Polyaminen Apoptose triggern zu können (Thomas et al., 2001). Diese apoptotische Form des Zelltodes, die im autologen Prozess des Zelllebens verankert ist, eliminiert u.a. nicht mehr funktionierende, überschüssige oder fehlerhafte bzw. kranke Zellen wie z.B. neoplastische, infizierte Zellen oder auch Abwehrzellen nach überstandener Infektion. Ferner ist die Apoptose von essentieller Bedeutung in der Embryonal- und Organentwicklung, wie bei der Degeneration der Interdigitalhäute in der Embryogenese. Ebenso garantiert die Apoptose die zelluläre Homöostase im Organismus, wie z.B. bei der Elimination nicht brauchbarer oder sogar schädlicher Zellen des Immunsystems, zur Selektion der Keimzellen oder auch zur Erhaltung der Plastizität im zentralen Nervensystem. Die deregulierte Apoptose spielt eine entscheidende pathophysiologische Rolle bei der

Krebsentstehung wie auch bei kardiovaskulären Erkrankungen (Rudin et al., 1997). Typischerweise bleibt die Zellmembran der apoptotischen Zelle intakt, der Zellkern schrumpft (Karyopyknose) und wird fragmentiert (Karyorrhexis). Anschließend können die membranten Zellprodukte von Makrophagen eliminiert werden, ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt. Der Vorgang der Apoptose betrifft die Einzelzelle ohne Schädigung der umliegenden Strukturen.

Der Ablauf der Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterscheiden: In eine Initiationsphase, bei der man noch einmal einen extrinsischen von einem intrinsischen Weg differenziert, und eine anschließende Effektorphase. Der extrinsische Weg wird dadurch geebnet, dass es zu einer Interaktion zwischen einem Liganden und einem Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie (z.B. CD 95) kommt. Häufige Liganden sind z.B. der Tumornekrosefaktor (TNF) oder weitere Zytokine, die u.a. von Abwehrzellen ausgeschüttet werden. Sie binden an die sog. „Todesrezeptoren“ der Zielzellen, die das Signal über eine „Todesdomäne“ (DD, „death domain“) ins Innere der Zelle vermitteln. Durch die ligandenvermittelte Trimerisierung des Rezeptors verändern sich die Todesdomänen, so dass Adaptormoleküle mit eigener Todesdomäne interagieren können. Hierdurch kommt es zu Beginn zur Ausbildung eines „TNF-Rezeptor assoziierten Proteins“ (TRADD). Folglich bindet an die Todesdomäne der TRADD das „Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD). Dieses FADD verbindet sich mit ihrer weiteren Todeseffektordomäne (DED, „death effector domain“) mit der proCaspase 8 zu einem Komplex. Die Caspase 8 wird aktiviert, wodurch es zu einer Rückkopplung und weiteren Aktivierung von anderen Caspasen kommt (Regula et al., 2003). Caspasen (Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen) sind spezifische Proteasen, die schließlich Endonukleasen aktivieren. Endonukleasen sind DNA-fragmentierende Enzyme, die den Zelltod schließlich vollstrecken. Außerdem verändern Caspasen das Zytoskelett und die Kernlamina, so dass sie in zu phagozytierende Körperchen zerfällt.

Dem extrinsischen Weg steht der intrinsische gegenüber, der sich dadurch auszeichnet, dass intrazelluläre Faktoren wie z.B. das mitochondriale Cytochrom c oder andere pro-apoptotische Substanzen wie Smac/DIABLO eine Apoptose einleiten. Diese Stoffe gelangen aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma bei entsprechender Schädigung der Zellorganellen (u.a. Schwellung bei Hypoxie oder Ischämie). Der erwähnte Signalmechanismus wird durch unterschiedliche Trigger wie p53 initialisiert. P53, ein sog. Tumor-Suppressor, ist ein

Transkriptionsfaktor, der aus dem Karyoplasma bei DNA Schädigung freigesetzt wird. Dieser Tumor-Suppressor verursacht eine Hochregulation bestimmter pro-apoptotischer Genabschnitte aus der Bcl-2 Familie wie z.B. das in dieser Arbeit gemessene Bax. Gegenspieler des in diesem Signalweg wichtigen Bax sind die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie wie Bcl-2 und Bcl-xl sowie die IAPs (Apoptose-inhibitorische Proteine, wie Survivin), welche die Mitochondrienmembran stabilisieren und die Porenbildung mit weiterer Cytochromausschüttung unterdrücken (Bonavita et al., 2003). Den pro-apoptotischen Substanzen wie Bax wird eine weitere Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien zugeschrieben (siehe Abb. 1.1). Neben dem beschriebenen Bax wirken auch zahlreiche andere Toxine direkt auf die Mitochondrien, was ebenfalls zur Freisetzung von Cytochrom c führt und so eine extrinsische Apoptose initiiert (Yuan et al., 2002). Cytochrom c bindet sich mit dATP an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) wodurch es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommt (Qi et al., 2010). Hierdurch wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungsdomäne) von Apaf-1 so konfiguriert, dass es zu einer Verbindung mit der CARD Domäne der Procaspase 9 kommt.

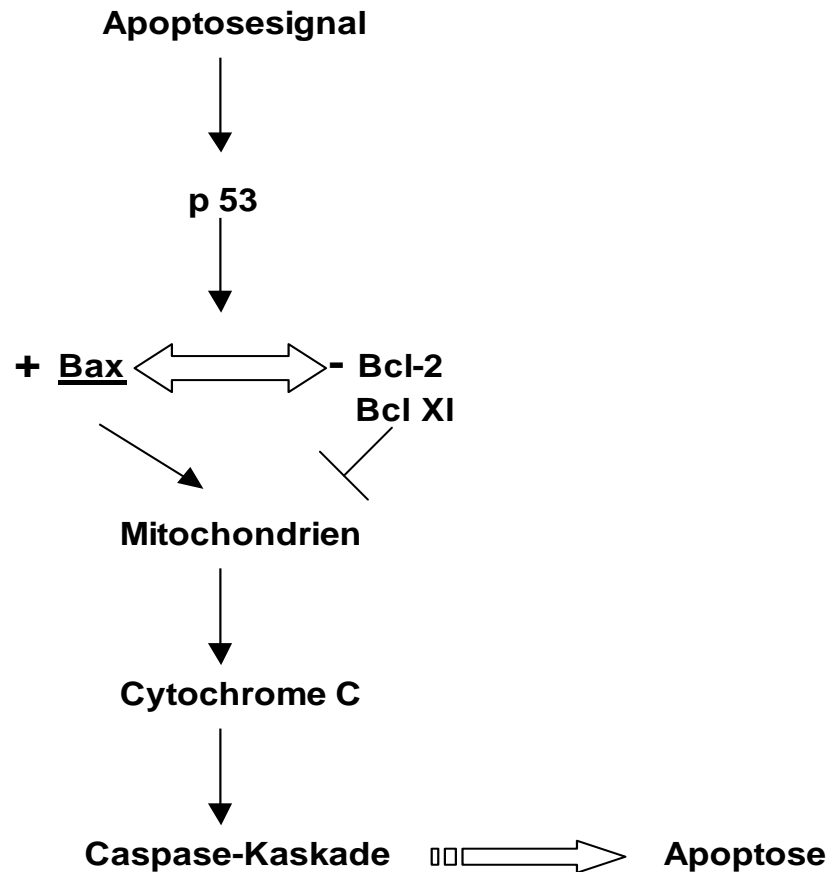


Abb. 1.1: Pro- und antiapoptotische Mitglieder der Apoptosekaskade

1.1.3 Hypertrophiemarker ANF

ANF atrialer natriuretischer Faktor ist ein kardiales Peptidhormon, das eine Rolle bei Herzinsuffizienz und Ischämie spielt (Loennechen et al., 2001). ANP ist ein wirksames Diuretikum, welches die Na^+ -Ionen-Sekretion fördert, sowie Vasorelaxans. ANP wird insbesondere vom Vorhofmyokard bei verstärkter Volumen- oder Druckbelastung z.B. im

Rahmen einer Herzinsuffizienz, einer Blutdruckerhöhung sowie bei einem (congenitalen) Herzfehler ausgeschüttet. Die Höhe der Ausschüttung wird klinisch häufig als Ausprägung der kardialen Symptomatik interpretiert (Fyhrquist et al., 1993).

Darüber hinaus kann gezeigt werden, dass das ANP-Gen in ischämischen Kardiomyozyten im Sinne einer möglichen Adaptation hochreguliert wird. ANP, das sowohl auf die Nieren wie auch auf die glatte Muskulatur arterieller Widerstandsgefäße wirkt, induziert bei den Zielzellen eine cGMP Erhöhung, indem es membranständige Guanylylcyclasen aktiviert (Han et al., 2003). cGMP ist dafür verantwortlich, dass die Proteinkinase G aktiviert wird, welche wiederum ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpen in der Plasmamembran durch Phosphorylierung aktiviert. Dies bewirkt eine Erhöhung des Ca^{2+} -netto-Auswärtsstromes aus der Zelle und eine gleichzeitige Relaxierung. An der Niere bewirkt ANP eine Erhöhung der Ausscheidung des osmotisch wirksamen Na^+ , was konsekutiv zu einer Verminderung des Plasmavolumens führt und so auch zu einer Blutdrucksenkung beiträgt (Soares et al., 1999).

1.1.4 Rolle der ODC

Das Protein Ornithinedecarboxylase (ODC) spielt eine entscheidende Rolle als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym im Metabolismus biogener Amine, welche u.a. kardiale Hypertrophie und Wachstum regulieren (Bartolome et al., 1980). Das Enzym ist aus insgesamt 461 Aminosäuren aufgebaut und besitzt mit wenigen Minuten bis zu einer Stunde eine der kürzesten Halbwertszeiten aller Enzyme. Sie ist das wichtigste Schlüsselenzym und der entscheidende induzierbare Regulationsfaktor, indem es Ornithin zu Diaminoputrescin katalysiert. Ornithin stellt ein Intermediat der Polyaminsynthese dar, welches aus Arginin durch die Arginase entsteht. Die erfolgte Synthese von Diaminoputrescin wird über weitere Zwischenstufen zu Putrescin, Spermidin und Spermin umgewandelt (siehe Abb. 1.2). Diese entstandenen Polyamine sind multivalente organische Kationen, die durch die Interaktion mit negativ geladenen Polyanionen wie RNA und DNA einen neutralisierenden Effekt initiieren, und somit gewisse Vorgänge

stabilisieren können. So verbessert der Einsatz von Spermidin vor einer anschließenden Ischämie die Funktionserholung des Herzens (Zhao et al., 2007). Ebenso schwächt es die Apoptose in neonatalen Kardiomyozyten (Han et al., 2007). Des weiteren sind die Polyanionen in der Lage die RNA- bzw. DNA-Biosynthese zu stimulieren, weshalb sie auch als Wachstumsfaktoren bezeichnet werden. Die Ornithindecaboxylase ihrerseits ist durch verschiedene Umstände zu steuern und reagiert auf Einflüsse durch Wachstum und Toxizität (Ackermann et al., 2003). So ist es möglich die ODC-Konzentration in Mammalierzellkulturen um das 10- bis 200-fache Ansteigen zu lassen durch die Zugabe von Somatotropin, Kortikosteroiden sowie Testosteron. Dies verdeutlicht die Möglichkeit der Ornithindecaboxylase als ein entscheidender Ansatzpunkt zu einer antimitotischen Chemotherapie zu sein (Thomas et al., 2001).

Neben der oben beschriebenen Synthese läuft auch der Abbau der Ornithindecaboxylase kontrolliert ab. Hierbei spielt das sog. Antizym, ein Enzym für die Degradation der ODC, eine bedeutende Rolle. Es ist ein Protein, welches aus 227 Aminosäuren aufgebaut ist und dessen C-terminale Reste spezifisch an die Aminosäuren 117-140 der ODC binden. Das Antizym weist einerseits eine hohe Affinität zum inaktiven ODC-Monomer auf, verbindet sich andererseits auch mit dem katalytisch aktiven Homodimer der ODC. Hierbei interagieren zwei Antizymmoleküle mit einem ODC-Homodimer und bilden inaktive Antizym-ODC-Heterodimere (Coffino, 2001). Die Bindung an ODC bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms, die das C-terminale Degradationssignal der ODC für das 26S Proteasom zugänglich macht. Eine Aktivierung der Ornithindecaboxylase konkurriert mit der eNOS um das gemeinsame Substrat Arginin.

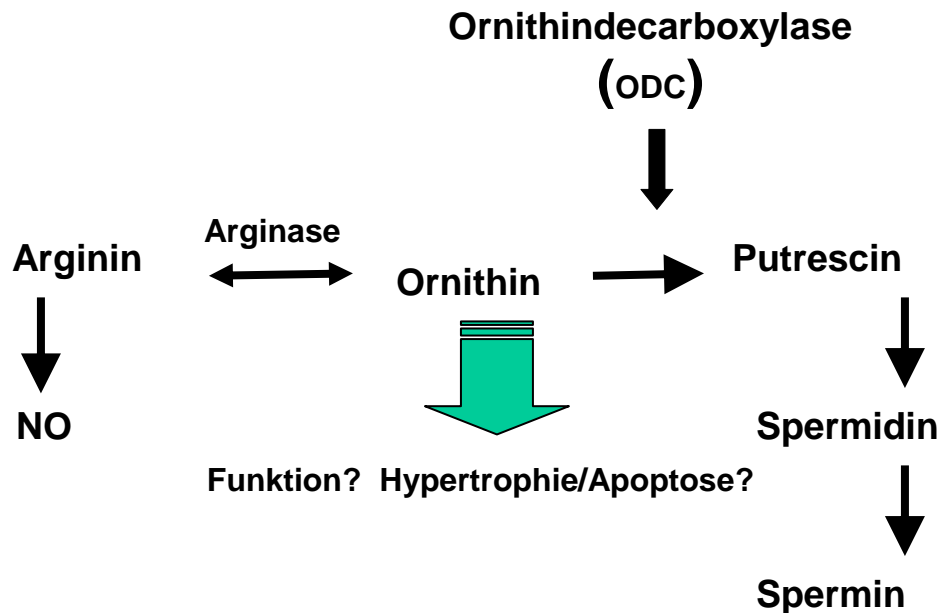


Abb. 1.2: Rolle des Schlüsselenzyms ODC und sein Einfluss auf den Polyaminstoffwechsel

1.2 Aufgabenstellung

Folgenden Fragen wurden in der Arbeit nachgegangen:

- Die Versuchsreihen befassen sich jeweils mit den Polyaminen in Bezug auf die normoxe und die hypoxe Myokardfunktion. Wie ist die Funktionserhöhung der Herzen in Abhängigkeit von der ODC?
- Wie ist das Expressionsmuster der pro- und anti-apoptotischen Gene Bax sowie Bcl-2 in Abhängigkeit der ODC?
- Wie verhält sich die Expression des Hypertrophiegens ANF in Abhängigkeit der ODC?
- Welche Unterschiede existieren bezüglich dieser Gene zwischen rechtem und linkem Ventrikel?

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien

Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylether	Roth, Karlsruhe
DFMO	Calbiochem
Ethanol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
NaHCO_3	Merck, Darmstadt

2.1.2 Spezielle Chemikalien

Isoprenalin	Sigma, Taufkirchen
Putrescin	Sigma, Taufkirchen
Trifast	peqlab, Erlangen

2.1.2.1.1 Reverse Transkription

Reverse Transkriptase (M-MLV)	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
5xRT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
RNAasin	Promega, Mannheim
Oligo-dT ₍₁₅₎	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

dNTP-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
iQ SYBR Green Supermix	Biorad, München

Primer:

ANF forward:	5'-ATG GGC TCC TCC TCC ATC AC-3'
ANF reverse:	5'-TCT TCG GTA CCG GAA GCT G-3'
BAX forward:	5'-CCT GAG CTG ACC TTG GAG CA-3'
BAX reverse:	5'-CCT GGT CTT GGA TCC AGA CA-3'
Bcl2 forward:	5'-TTC TTT CCC CGG AAG GAT GG-3'
Bcl2 reverse:	5'-GTC TGC TGA CCT CAC TTG TG-3'
Bcl xl forward:	5'-ATG AAC TCT TTC GGG ATG GG-3'
Bcl xl reverse:	5'-GAT CCA CAA AAG TGT CCC AG-3'
BNP forward:	5'-ATG ATT CTG CTC CTG CTT TTC C-3'
BNP reverse:	5'-TCT GCA TCG TGG ATT GTT CTG-3'
HPRT forward:	5'-CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT-3'

Material

HPRT reverse:	5'-CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC-3'
ODC forward:	5'-GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA-3'
ODC reverse:	5'-AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG-3'

Im folgenden sind die Annealingtemperaturen aufgeführt:

<u>Primer</u>	<u>Annealingtemperatur</u>
ANF	58° C
BAX	58° C
Bcl2	56° C
Bcl xl	65° C
BNP	58° C
Hprt	63° C
ODC	58° C

2.1.2.3 Weitere Chemikalien

Die übrigen verwendeten Chemikalien werden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) und Calbiochem (Schwalbach/Taunus) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien werden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Langendorff-Perfusionsanlage

Digitale Analysewaage	Mettler Toledo, Gießen
Glasgeräte	
Heizrührer	IKA, Staufen
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Bauchdeckenschere (gebogen, 160 mm)	Aesculap, Tuttlingen
Präparierschere groß (170 mm)	Aesculap, Tuttlingen
Präparierschere klein	Aesculap, Tuttlingen
Kapselpinzette	Eickemeyer, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen

2.2.1.1 PCR

Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
iCycler	Biorad, München

2.2.1.2 Sonstige Geräte

Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Glasgeräte	Schott, Mainz
Photometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Ultra-TURRAX T25	IKA, Staufen
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Mischer	Heidolph, Kehlheim
Zentrifugen	Kendro, Hanau

2.3 Auswertung

Software	Microsoft Excel Icycler iQ Optical System Software 3.0 A Biorad, München SpS5 17.0
Statistischer Test	Varianzanalyse, Student Neuman Keuls-Test

3 Methoden

3.1 Langendorff-Perfusion

3.1.1 Grundlagen der Perfusion isolierter Rattenherzen

Durch den Physiologen Oscar Langendorff (1853-1908) wird 1895 erstmals eine Methode ausgearbeitet, mit der es gelingt, die mechanische Tätigkeit des aus dem Körper völlig isolierten Säugetierherzens zu untersuchen. Das zugrunde liegende Prinzip besteht darin, eine mit Sauerstoff angereicherte Flüssigkeit wie z.B. Blut über eine Kanüle retrograd in den Anfangsteil der Aorta (Aorta ascendens) einzuführen, um das Herz zu perfundieren. Aufgrund des rückwärtsgerichteten Perfusionsflusses schließen sich die Aortenklappen, wie in der Diastole des Herzens in situ. Dies hat zur Folge, dass das Perfusat in die Kranzarterien gelangt und nach deren Durchlauf aus dem Sinus coronarius herausfließt. Somit wird eine ausreichende Versorgung des Myokards gewährleistet. Die Ventrikel bleiben weitgehend leer (Döring et al., 1985) und verrichten daher auch keine Druck-Volumen-Arbeit. Ein intaktes Reizleitungssystem im Zusammenhang mit der Versorgung des Myokards ist die Grundlage für diese spontan schlagende Herzpräparation.

Am Langendorff-Herz können verschiedene Parameter gemessen werden. So lassen sich z.B. die Kontraktionskraft des Arbeits-Myokards, der Gesamtdurchfluss durch das Koronargefäßsystem, bioelektrische Größen (EKG, monophasische Verletzungspotentiale) sowie der Herzrhythmus erfassen.

Ferner ist es möglich, den Myokardstoffwechsel des fixierten Herzens biochemisch zu studieren. In der vorliegenden Studie wird das Langendorff-Herz mit verschiedenen Substanzen behandelt, die in den Bioaminstoffwechsel eingreifen. Auch die Situation der Ischämie wird in diesem Zusammenhang untersucht, was durch die temporäre Unterbrechung des Perfusionsflusses

induziert wird. Das dann vorbehandelte Herz kann dann durch den Nachweis entsprechender Gene in der PCR untersucht werden.

3.1.2 Aufbau der Langendorff Anlage

Zur Perfusion der isolierten Rattenherzen wurde eine Perfusionsanlage nach LANGENDORFF eingesetzt. Hierbei befinden sich die Herzen in einer beheizten (37 °C) und geschlossenen Kammer. In einem über dieser Kammer gelegenen Pufferreservoir wird Perfusat mit Carbogen®, einem Gemisch aus 95% Sauerstoff (O₂) und 5% Kohlendioxid (CO₂), begast, danach durch einen Wärmetauscher geleitet und auf 37°C erwärmt. Zwischengeschaltete Dreiwegehähne ermöglichen das Zuführen unterschiedlicher Lösungen.

Perfusionslösung

modifizierte Tyrode – Lösung, welche bereits beschrieben wurde (Grohé et al., 2004).

pH 7,4 bei einer Temperatur von 37°C und bei Anwesenheit von O₂ und CO₂.

NaCl	140 mmol/l
KCl	2,7 mmol/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 mmol/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 mmol/l
Glucose	5,0 mmol/l
CaCl ₂ x H ₂ O	1,8 mmol/l
NaHCO ₃	24 mmol/l

Ein Latexballon, der im linken Ventrikel platziert wird, sowie die Perfusionskanüle sind jeweils mit Druckaufnehmern verbunden und dienen der Messung und Protokollierung. Dabei werden der Perfusionsdruck (PerfPres), auch diastolischer Aortendruck genannt, der linksventrikuläre systolische (SysP) und der linksventrikuläre diastolische Druck (DiasP), sowie die Herzfrequenz

(HF) aufgezeichnet. Zur Bestimmung des mittleren Perfusionsflusses wird abfließendes Perfusat mit einem Messzylinder aufgefangen (siehe Abb. 3.1).

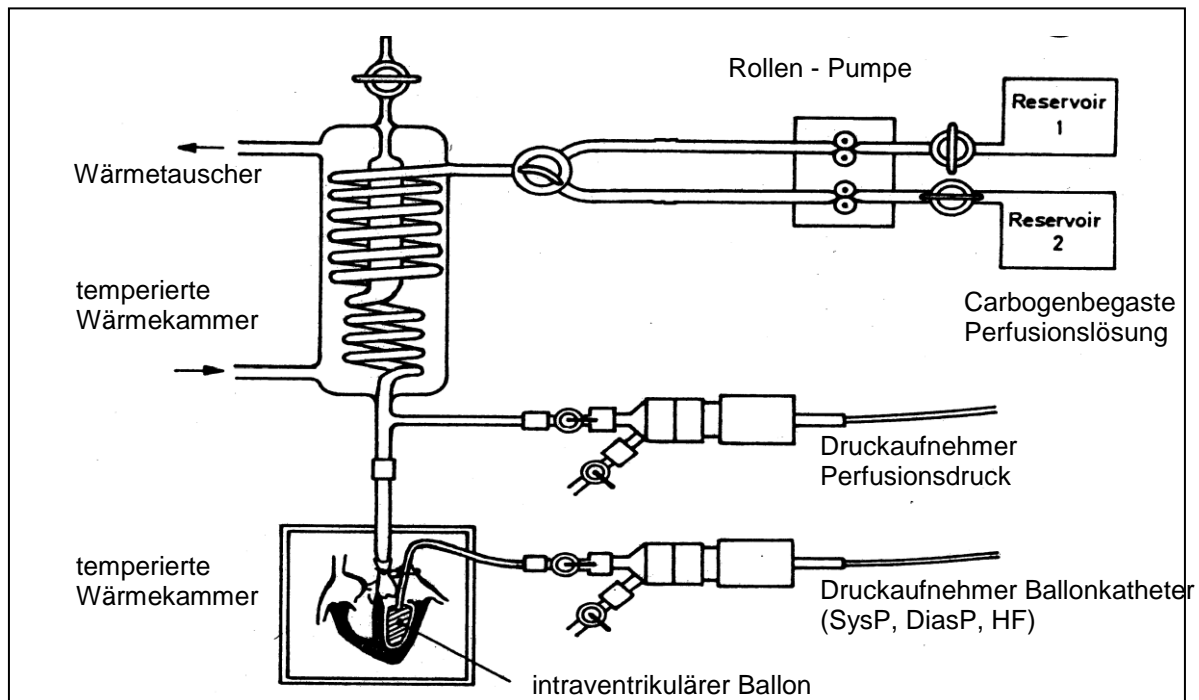


Abb. 3.1.: Aufbau der Perfusionsanlage nach Langendorff (Döring et al., 1985)

3.1.3 Versuchstiere

Die Herzen werden aus adulten weiblichen Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von ca. 220g isoliert. Die Tiere stammen aus eigener Züchtung des Tierstalls des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen und haben freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter: Altromin) und Wasser.

3.1.4 Präparation der isolierten Herzen

Durch eine kurze Diethylethernarkose werden die Ratten in den Zustand einer tiefen Bewusstlosigkeit versetzt, was durch den Cornealreflex und eine Kontrolle des Muskeltonus überprüft wird. Daraufhin werden die Ratten durch Genickbruch getötet und ihr Abdomen eröffnet. Nach dem Entfernen des Zwerchfells wird das Herz mit den anhängenden Organen entnommen und sofort in eine Petrischale mit isotonischer, 4°C kalter Kochsalzlösung gegeben um alle Stoffwechselprozesse zu verlangsamen und so eine Ischämie zu verhindern.

Jetzt entfernt man die Lunge und stellt die Aorta ascendens dar. Hierzu werden die Reste des Ösophagus, der Trachea und des Thymus durch vorsichtige Präparation entfernt und die Aorta im Aortenbogen abgesetzt. Anschließend wird das Herz im Aortenbogen an einer Perfusionskanüle aus Edelstahl (\varnothing 1,8 mm) der LANGENDORFF – Perfusionsanlage mit einer Klemme befestigt und mit Operationszwirn (Nr. 40) endgültig fixiert. Dabei ist darauf zu achten, die Kanüle nicht zu tief einzuführen um den Schluss der Aortenklappen nicht zu beeinträchtigen und die Coronarostien nicht zu verschließen. Ab diesem Zeitpunkt werden die Herzen bereits mit erwärmtem, Carbogen® - begastem Standardpuffer versorgt. Die Ausgangsrate beträgt 2,5 ml/min und wird während der Stabilisation auf einen mittleren Fluss, der einem Perfusionsdruck von 50mm Hg entspricht, gesteigert. Zuletzt wird der Latexballon (Größe 5) in den linken Ventrikel eingeführt.

3.1.5 Versuchsdurchführung

Eine Kontraktion oder Relaxation der glatten Muskulatur der Coronararterien führt zu einer Änderung des Gefäßradius. Daher kommt es bei einer Perfusion mit konstantem Fluss zu einer umgekehrt proportionalen Änderung des Perfusionsdrucks (Döring et al., 1985).

Bei den Versuchen unter flusskonstanten Bedingungen wird der mittlere Fluss, nach einer Stabilisierungsphase von ungefähr 20 min. von einer Rollpumpe konstant gehalten, die sich zwischen Pufferresevoir und Herz befindet.

Mit Anhängen des isolierten Herzens beginnt die oben erwähnte Stabilisierungsphase. Während dieser wird der Füllungsgrad des Ballons und die Flussrate langsam auf den Basalwert eingestellt. Dieser beträgt für den diastolischen Druck 11 – 12 mm Hg, was einem physiologischen diastolischen Druck entspricht, und stellt eine mittlere Flussrate von 10 ml/min. ein, die einen Perfusionsdruck von 50 mm Hg erzeugt.

Warmblüterherzen werden in situ mit einem Druck perfundiert, der weitgehend dem diastolischen Aortendruck (70 – 90 mm Hg) entspricht. Allerdings wäre dieser Perfusionsdruck für das isolierte Herz aufgrund mehrerer Begründungen zu hoch, weshalb ein basaler Perfusionsdruck von 50 mm Hg eingestellt wird. Bei salinen Lösungen ist der Fluss doppelt so hoch wie bei der Verwendung von Vollblut oder Plasma, da der Strömungswiderstand der salinen Perfusionslösung nur etwa 50% des Plasmawerts beträgt. Weiterhin kann es durch die konstante unphysiologische Belastung der Aortenklappen zum unerwünschten Durchschlagen kommen. Zusätzlich würde das Auftreten des Gewebeödems, welches durch den fehlenden kolloidosmotischen Druck ohnehin entsteht, verstärkt (Döring et al., 1985).

Nach 20 Minuten Äquilibrierungszeit haben die gemessenen Herzfunktionen ein stabiles Plateau erreicht und der Versuch kann gestartet werden.

Dabei erfolgt je nach Protokoll (Versuchsprotokolle siehe Ergebnisteil) die Perfusion mit unterschiedlichen Substanzen, die der Perfusionslösung in den verschiedenen Pufferreservoirs zugefügt werden.

3.1.6 Erfassung physiologischer Parameter

Bei der Messung werden fünf unterschiedliche physiologische Parameter erhoben: der Fluss, der Perfusionsdruck, die Herzfrequenz, der systolische sowie der diastolische Druck. Der

linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) entspricht der Differenz zwischen systolischem und diastolischem Druck. Die Messung des systolischen bzw. des diastolischen Drucks und der Herzfrequenz erfolgt über den im linken Ventrikel positionierten Latexballon. Dieser ist mit aqua bidest. gefüllt und mit einem Druckaufnehmer verbunden. Durch den Füllungsgrad des Ballons wird der Druck innerhalb des Ventrikels auf einen Basalwert zwischen 11 – 12 mm Hg eingestellt. Diese Füllung des Ballons wird für den Rest des Versuchs konstant gehalten (siehe Abb. 3.2).

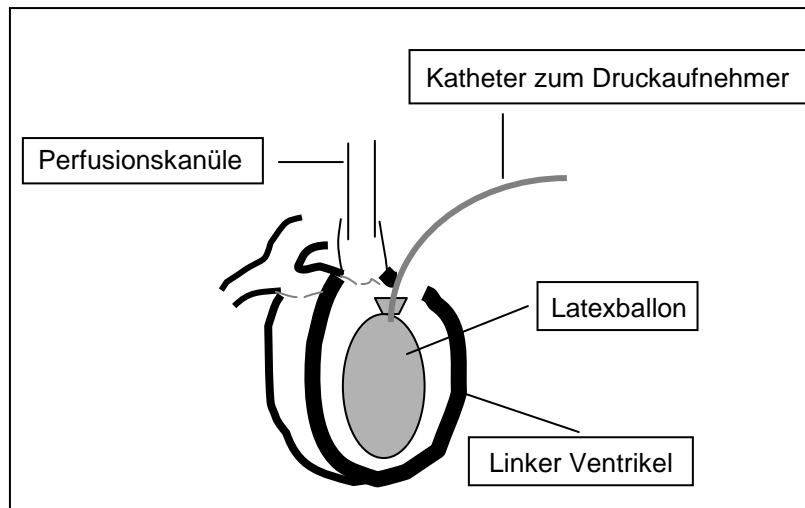


Abb. 3.2.: Schematische Darstellung der Lage des Ballons

Die gemessenen Impulse werden über einen externen Aufnehmer und einen Analog – Digital – Wandler zu einem PC übermittelt.

Der Perfusionsdruck wird über ein mit aqua bidest. gefülltes Kathetersystem, welches oberhalb der Perfusionskanüle abzweigt und wiederum mit einem Druckaufnehmer verbunden ist, protokolliert.

3.1.7 Versuchsprotokolle

64 Herzen aus Wistar-Ratten wurden salin perfundiert, einer 45 minütigen Nullfluss-Ischämie mit zweistündiger Reperfusion ausgesetzt und in acht Gruppen eingeteilt: Normoxie (Nx), Normoxie+Isoprenalin (Nx+ISO), Normoxie+Difluoromethylornithin (Nx+DFMO), Normoxie+Difluoromethylornithin+Isoprenalin (Nx+DFMO+ISO), Ischämie/Reperfusion (I/R), Ischämie/Reperfusion+Isoprenalin (I/R+ISO), Ischämie/Reperfusion+Difluoromethylornithin (I/R+DFMO) und Ischämie/Reperfusion+Difluoromethylornithin+Isoprenalin (I/R+DFMO+ISO).

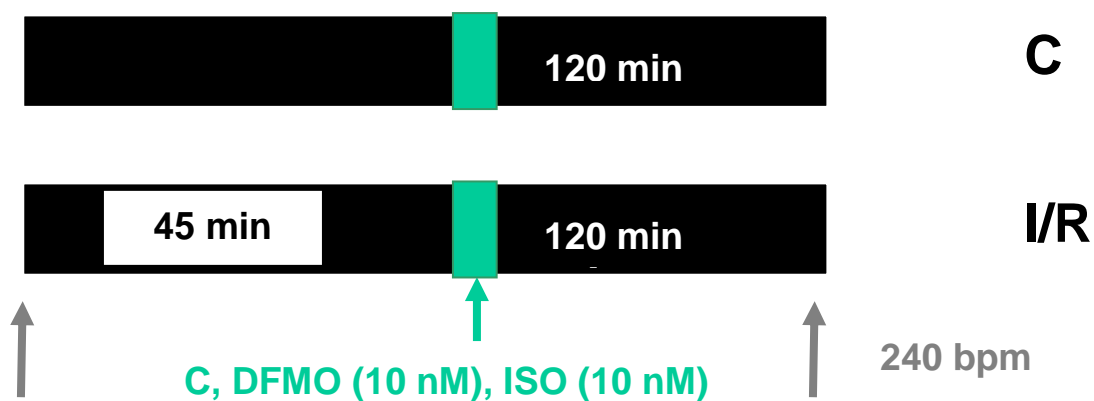


Abb. 3.3: Versuchsprotokolle der Herzen, zweier Gruppen mit/ohne 45 minütigen Perfusionsstop und anschließender 120 minütiger/kontinuierlicher Perfusion. Nach 30 minütiger Reperfusion erfolgte die Zugabe der jeweilig zu untersuchenden Substanzen. Zu Beginn und am Ende wurden die Herzen mit 240 Schlägen pro Minute für fünf Minuten gepaced.

3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die methodische Verbindung der Reversen Transkriptase von mRNA mit der Amplifikation der resultierenden cDNA durch die PCR (RT-PCR) wird anfänglich von Powell und Kollegen im Jahr 1987 beschrieben. In den folgenden Jahren wird diese Methode häufig von Forschungslaboratorien benutzt, um schnell und sensitiv spezifische RNA aufzudecken und zu quantifizieren. RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion) ist aktuell die sensitivste Technik zur Aufdeckung und Quantifizierung für mRNA. Im Vergleich zu zwei weiteren Methoden, die mRNA-Gehalte bestimmen, die Northern-Blot-Analyse und dem RNase-Protection-assay, kann die RT-PCR auch in wesentlich kleinere RNA-Proben deren Gehalt ermitteln.

Real-time-PCR ist eine Methode zur gleichzeitigen DNA-Bestimmung und Amplifikation. Die Amplifikation der DNA wird spezifisch durch die Polymerase-Ketten-Reaktion geleistet. Nach jedem Zyklus einer DNA-Amplifikation wird der Gehalt ermittelt. Gängige Methoden zur Quantifizierung beinhalten den Gebrauch von fluoreszierendem Farbstoff, der sich an den Doppelstrang der DNA anlegt. Bei der Hybridisierung der komplementären DNA kommt es dann zur typischen Fluoreszenz.

3.2.1 Präparative RNA-Isolierung

Die bei -80° C tiefgefrorenen Herzen werden, unterteilt in rechten und linken Ventrikel, zusammen mit 1 ml Trifast in ein Reagenzglas gegeben. Dann werden die Herzproben im Reagenzglas im Ultraturrax zerhackt. Anschließend wird die Suspension in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. In einem anschließenden Schritt wird die Suspension mit 100 µl Chloroform versetzt und gut durchmischt,

so dass sich die RNA herauslösen kann. Das jetzt weißliche Gemisch wird kurz stehen gelassen, um es dann zu zentrifugieren. Die darauffolgende Zentrifugation bei 4° C für 15 Minuten und einer Umdrehung von 15000 x rpm trennt die gesamte RNA von DNA und Proteinen. Dies ist daran zu erkennen, dass sich drei Phasen gebildet haben. Die obere klare Phase enthält die gesamte RNA, wohingegen sich in der unteren gelblichen Phase die DNA und in der mittleren dünnen die Proteine herausgelöst haben. Die obere Phase wird nun vorsichtig abpipettiert und in ein neues, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wird zu diesen nun die gleiche Menge an Isopropanol hinzupipettiert und kurz vermischt.

Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben weiterverarbeitet und bei 4° C für 15 Minuten und 15000 x rpm zentrifugiert. Hierdurch kann die gefällte RNA in einem Pellet nach Abschütten des Überstandes gewonnen werden. In einem weiteren Schritt wird sie mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend, wie im vorherigen Schritt beschrieben, zentrifugiert.

Die im Pellet enthaltene RNA wird 30 min. bei Raumtemperatur getrocknet und in 10-20 µl sterilem aqua bidest. resuspendiert.

3.2.2 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes

Anschließend an die RNA-Isolierung wird die RNA-Menge quantitativ photometrisch bestimmt. Hierzu werden 3 µl der RNA-enthaltenden Lösung entnommen, in 1 ml aqua bidest. gelöst und danach bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen. Um die Effizienz der Proteintrennung zu überprüfen, wird zusätzlich die Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Das errechnete Verhältnis der beiden Extinktionswerte sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, um eine möglichst reine RNA-Suspension vorliegen zu haben. Da die benötigte Menge an

RNA für die Reverse Transkription 1 µg ist, muss anschließend das Volumen ausgerechnet werden, in dem diese Menge RNA gelöst ist.

3.2.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Für die Reverse Transkription wird je 1 µg RNA pro Ansatz zur cDNASynthese eingesetzt, wobei diese Menge mit sterilem aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 5 µl ergänzt wird. Diese 5 µl werden anschließend bei 60° C für 10 Minuten im Thermocycler denaturiert. Während dieser Zeit kann der Mix angefertigt werden.

Der Mix für einen Ansatz hat folgende Bestandteile:

RT-Ansatz:

oligo-dT ₍₁₅₎	1,0 µl (0,1 mg/ml)
5xRT-Puffer	2,0 µl
dNTPs	1,0 µl (10 mmol/l je Nukleotid)
RNA-sin	0,2 µl (25 U/ml)
DTT	0,5 µl (0,1 mol/l)
Reverse Transkriptase	0,3 µl (200 U/ml)

Zum Ende der 10 Minuten werden die Proben auf Eis gestellt und 5 µl des Mix je Probe hinzupipettiert. Die Reverse Transkription findet bei 37° C für eine Stunde im Thermocycler statt; mit einer anschließenden Denaturierung der gebildeten cDNA bei 95° C für fünf Minuten. Bis zur späteren Verwendung können die Proben bei –80° C tiefgefroren werden.

3.3 Quantitative PCR

Die Methode der real-time-PCR basiert auf der Aufdeckung und Quantifizierung eines fluoreszierenden Farbstoffes (Lee et al, 1993; Livak et al, 1995). Die Stärke des Signals dieses Farbstoffes hängt direkt mit der Menge des gebildeten PCR-Produktes an DNA zusammen. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Stärke der aufgezeichneten Fluoreszenz sowie der Menge der durch die PCR gebildete DNA. Aufgrund dieser Aufnahmen wird es möglich die Menge des PCR- Produktes während der exponentiellen Phase zu bestimmen. Bei der Realtime PCR wird die Produktentstehung in Echtzeit verfolgt. Der in der Realtime-PCR verwendete DNA-sensitive Farbstoff ist SYBR® Green:

SYBR® Green ist ein sogenannter unsymmetrischer Cyaninfarbstoff. Der Farbstoff verbindet sich weitgehend unabhängig von der Sequenz in die kleinen Furche doppelsträngiger DNA, was mit einer ca. 100mal höheren Affinität passiert als mit Ethidiumbromid. SYBR® Green ist sensativer und weniger mutagen. Durch die Verbindung des Farbstoffes mit der modifizierten doppelsträngige DNA wird die Fluoreszenz stark erhöht, wobei das ausgesendete Fluoreszenzsignal proportional zur DNA-Konzentration ist. Dieses Fluoreszenzsignal wird jeweils einmal pro Zyklus, am Ende der Extensions-Phase detektiert. Hier sind die meisten SYBR® Green-Moleküle an die amplifizierte doppelsträngige DNA gebunden, weshalb das Fluoreszenzsignal dadurch am höchsten ist. Da SYBR® Green generell produktunspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, ist es notwendig zur Kontrolle der Amplifikationsreaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Es ist ein steiler Fluoreszenzabbruch erkennen, sobald die für das DNA Produkt spezifische Schmelztemperatur erreicht ist (siehe Abb. 3.4). Das DNA-Produkt wird zum Einzelstrang denaturiert und setzt somit den gesamten Fluoreszenzfarbstoff frei. Unspezifische Produkte sowie Primerdimere schmelzen bereits unterhalb dieser spezifischen Schmelztemperaturen (siehe Abb. 3.5) und können auf diese Weise sichtbar gemacht werden (Ririe et al., 1997). Desweiteren erlangt man durch die Kenntnis über den Schmelzpunkt der Produkte Aufschluss über deren Länge. Primerdimere von 20 bp Länge schmelzen bereits früher als das spezifische Produkt, dessen Länge in Abhängigkeit von der Primerwahl zwischen 50-200 bp liegt.

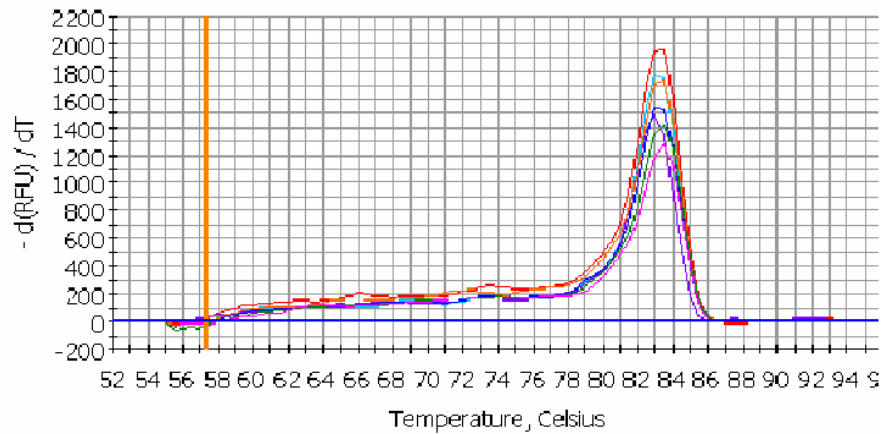


Abb. 3.4: Schmelzkurve ohne Primerdimere

Diese Abbildung zeigt die charakteristische Schmelzkurve des spezifischen Produktes bei ca. 83 Grad Celsius

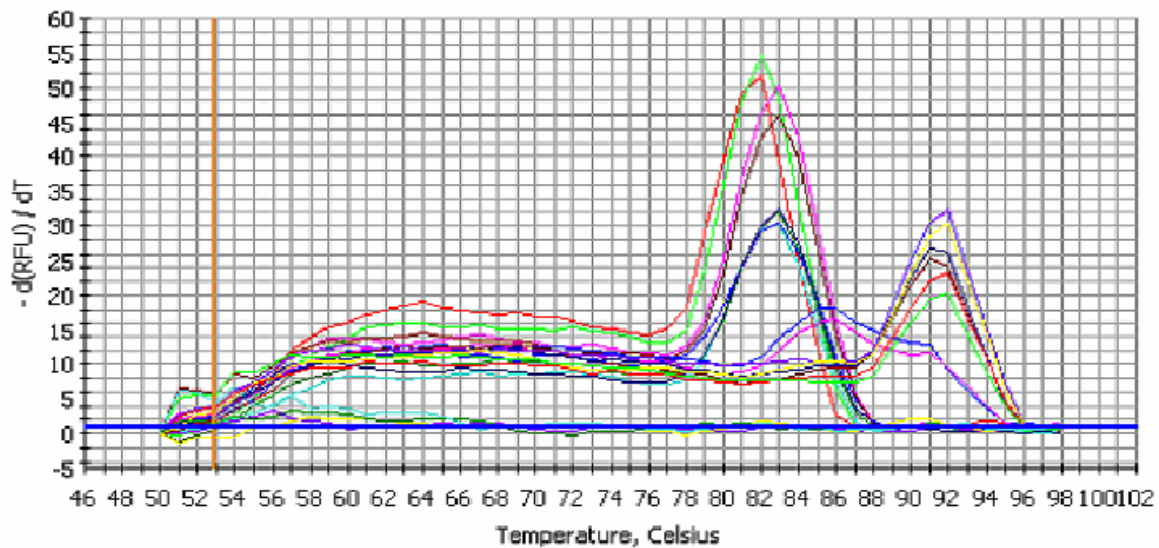


Abb. 3.5: Schmelzkurve mit Primerdimeren

Die ersten Graphen beschreiben die vorhandenen Primerdimere bei Temp. 82°C, wohingegen die die spezifischen Produkte bei Temp. 92°C liegen. Dazwischen sind jeweils die unspezifischen Produkte zu finden.

3.3.1 Erstellen einer Standardkurve

Vorraussetzung für die Analyse der Realtime PCR ist eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus. Dies wird zuvor durch die Ermittlung der Standardkurven überprüft, indem man Verdünnungsreihen der RNA-Konzentration von 1:10 bis 1:10000 ansetzt. Nur bei einer Verdopplung der Amplifikation zeigt die Standardkurve eine Steigung um $-3,3$ und ergibt somit eine Effizienz von ca. 100 % an (siehe Abb. 3.6).

Man kann durch verschiedene Gradienten die optimale Annealingtemperatur ermitteln und somit die Primer optimieren.

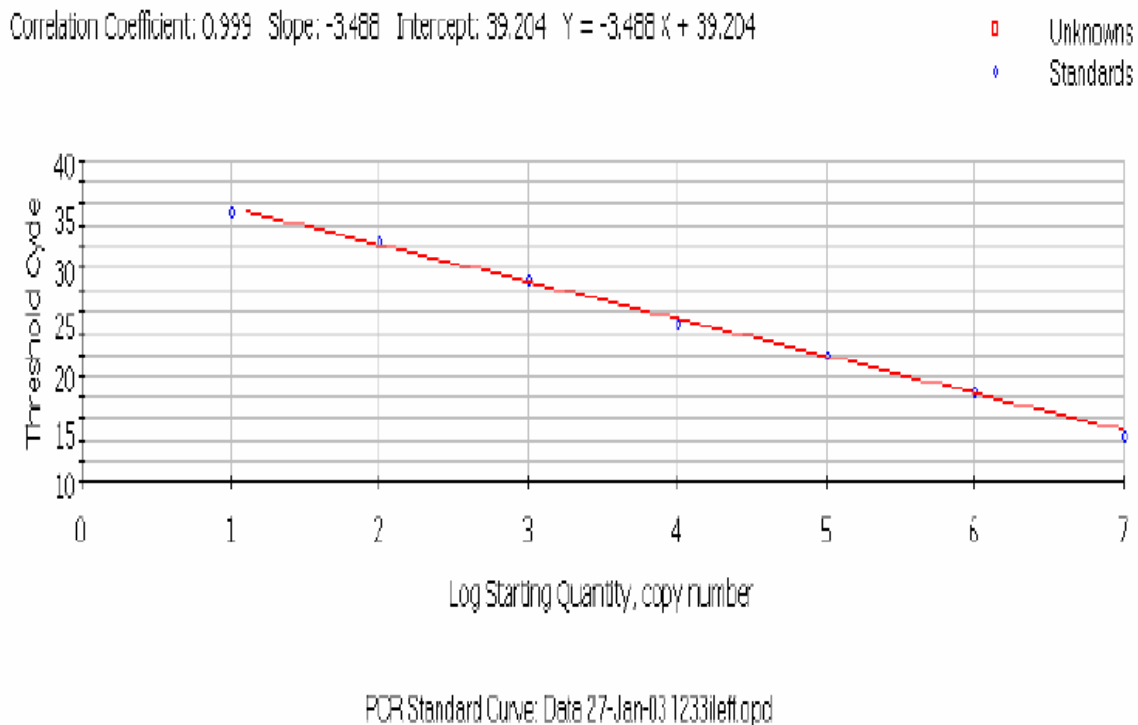


Abb. 3.6: Standardkurve

Diese Abbildung zeigt eine Standardkurve mit einer Steigung um $-3,5$, einen Korrelationskoeffizienten von 1 und eine Effizienz von ca. 100 %.

3.3.2 Auswahl des Housekeeping-Gens

Das so genannte Housekeeping-Gen dient in der Realtime-PCR dazu, um die Expression des zu untersuchenden Gens darauf zu beziehen. Es stellt ein ubiquitär und homogen exprimiertes Gen dar. Die Validität der Realtime-PCR hängt somit von der Wahl des Housekeeping-Gens ab. Es handelt sich bei dieser Studie um das HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), welches in konstanter Weise exprimiert wird und unter verschiedenen Untersuchungsbedingungen keine Reaktion zeigt.

3.3.3 Reaktionsbedingungen

Die PCR-Amplifikation erfolgt auf einem iCycler der Firma Biorad und wird in Doppelbestimmung in 20µl Mixturen ausgeführt, die aus SYBR-Green-PCR-Supremix, aqua bidest, dem Primer und 3µl cDNA bestehen. Die cDNA wird immer mit aqua bidest. 1:10 verdünnt. Die PCR-Konditionen werden folgendermaßen eingestellt: 15 min bei 95° C, um die Polymerase zu aktivieren, gefolgt von 45 Zyklen von jeweils 95° C für 30sec, dann bei der entsprechenden Annealingtemperatur (siehe Primer im Material Teil) sowie 72° C für 30sec für die Elongation. Zyklenzahl und Zyklendauer sind im Programmlauf dargestellt (siehe Abb. 3.7).

Die Daten werden mit der Bio-Rad iCycler iQ software ausgewertet. Die Signale werden als positiv angesehen, sobald die Intensität der Fluoreszenz (Zunahme der Fluoreszenz ΔR_n) 10 Mal höher war als die Standardabweichung der ursprünglichen Fluoreszenz (threshold cycle [CT]). CT Werte von 45 werden als negativ bewertet. Der threshold cycle oder CT Wert ist der Zyklus bei dem eine statistisch signifikante Zunahme von ΔR_n zuerst entdeckt wird.

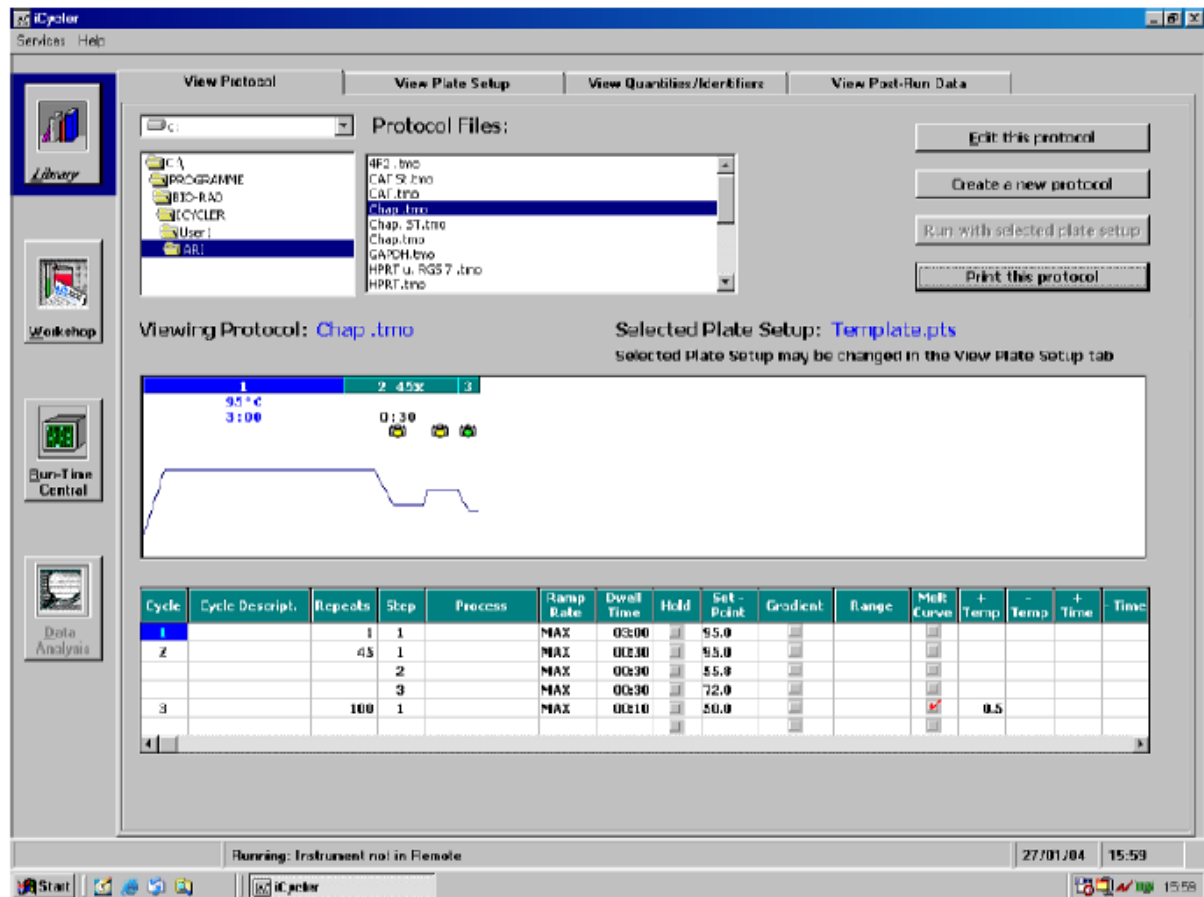


Abb. 3.7: iCycler Programmablauf

3.3.4 Auswertung der Realtime PCR

Die Auswertung findet über die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Pfaffl, 2001) statt. Diese kalkuliert die relative Expression eines Gens im Vergleich zu einem Referenzgen (Housekeeping Gen), in diesem Fall im Vergleich zum HPRT. Zunächst wird der „Threshold“ über die iCycler-Software ermittelt. Demnach wird die Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen den Zyklen 2 bis 10, in denen die Kurve noch keinen signifikanten Anstieg durch die Amplifikation erfährt, ermittelt.

Dann wird der Mittelwert aller Standardabweichungen der verschiedenen Proben mit 10 multipliziert. Dieser Wert wird als „Threshold“ betrachtet. Abschließend wird der „Threshold Cycle“ CT bestimmt. Das ist der Zyklus, an dem die Amplifikationskurve einer Probe den „Threshold“ schneidet (siehe Abb. 3.8).

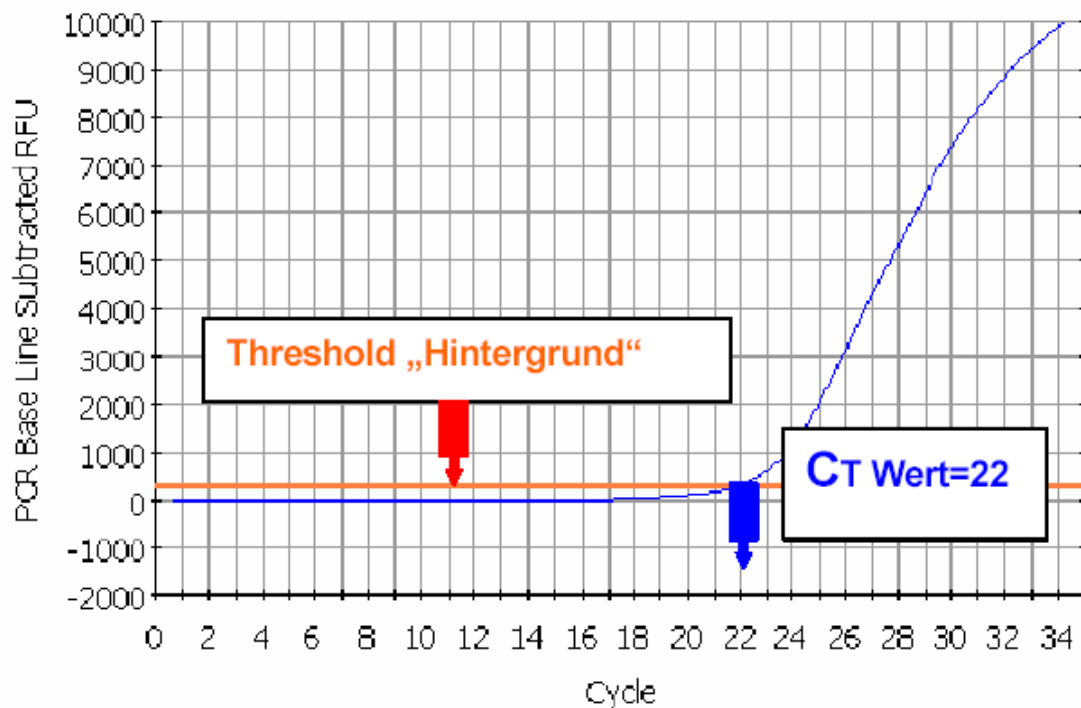


Abb. 3.8: Ermittlung des CT-Wertes

Zur Berechnung der relativen Expression wird der CT-Wert des Target Gens von dem CT Wert des HPRT Gens subtrahiert:

$$1. \text{ CT (Target)} - \text{CT (HPRT)} = \Delta\text{CT},$$

Dann wird die Differenz zwischen den ΔCT -Werten der behandelten Zellen und der Kontrolle berechnet:

$$2. \Delta\text{CT (induzierte Zellen)} - \Delta\text{CT (Kontrolle)} = \Delta\Delta\text{CT}$$

dieser Wert wird dann in die relative Expressionsformel eingesetzt:

$$3. \text{ relative Expression} = 2^{-(\Delta\Delta\text{CT})}$$

3. 4 Statistik

Die Darstellung der Expressionsanalysen erfolgte als box-and-whiskers-plots. Die obere und untere Begrenzung der Box entspricht jeweils dem 25% und 75% Quantil. In die Box selbst wird der Median eingezeichnet. Die Whiskers („Schnurrhaare“) werden an das obere und untere Ende der Box angehängt und definieren üblicherweise das 10% Quantil. Die außerhalb dieses Bereichs liegenden Extremwerte werden als separate Punkte eingezeichnet.

ANOVA und der Student-Newman-Keuls test für post hoc Analysen wurden benutzt, um Experimente bei denen mehr als eine Gruppe verglichen wurde, zu analysieren. Der Student's t-test für paarweise Proben wurde für Fälle angewandt, bei denen zwei Gruppen verglichen wurden. $P < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von Aktivierung und Inhibierung der ODC auf das post-ischämische Myokard

In den ersten Experimenten wurde der Effekt der Aktivierung oder der Inhibierung der Ornithindecaboxylase in Bezug auf die Funktionserholung der Herzen untersucht. Die Herzen wurden einer 45 minütigen Nullfluss-Ischämie und einer anschließenden 120 minütigen Reperfusion unterzogen. Die erhobenen Daten wurden dann mit Herzen verglichen, die identisch behandelt wurden ohne den 45 minütigen Perfusionsstop. Alle Herzen wurden zu Beginn der Experimente mit 240 Schlägen pro Minute für fünf Minuten gepaced. Für den Rest der Untersuchung konnten sie frei schlagen. Nach 30 minütiger Reperfusion wurde ein Teil der Herzen für 10 min mit Isoprenalin (10nM) perfundiert. Ein anderer Teil der Herzen wurde für 15 min mit DFMO perfundiert, beginnend 25 min nach Reperfusion. Eine dritte Gruppe wurde für 15 min mit DFMO perfundiert, davon die letzten 10 min gleichzeitig mit Isoprenalin stimuliert. Nach 120 min Reperfusion wurden die Experimente gestoppt. Es wurden keine Unterschiede bezüglich des Funktionsparameters des links ventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) in den acht verschiedenen Gruppen vor der jeweiligen Intervention festgestellt (siehe Abb. 4.1A). Der LVDP war ebenfalls in den vier Kontrollgruppen ohne Ischämie am Ende des Experiments nicht verändert (siehe Abb. 4.1B). Eine alleinige Ischämie mit anschließender Reperfusion machte sich in einer signifikanten Abnahme des LVDP bemerkbar. Ferner war kein Unterschied zwischen den Herzen mit und ohne Stimulation der β -Adrenorezeptoren festzustellen. Im Gegensatz dazu war die Funktionserholung der Herzen, die mit DFMO oder mit DFMO und Isoprenalin perfundiert wurden, abgeschwächt im Vergleich zu den Herzen mit alleiniger Ischämie und folgender Reperfusion (siehe Abb. 4.1B). Die durch Isoprenalin verursachte positive Inotropie wurde weder durch DFMO noch durch eine alleinige Ischämie abgeschwächt. In allen mit Isoprenaline behandelten Gruppen hat sich während der 10 minütigen Stimulation das „rate pressure product“ signifikant erhöht (siehe Abb. 4.2).

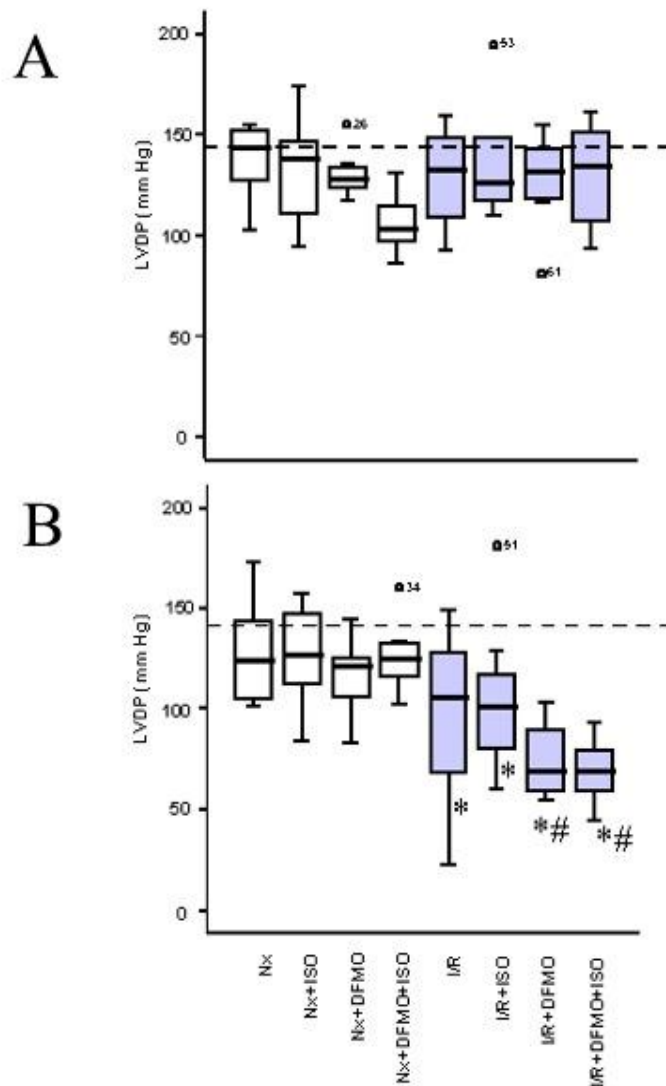


Abb. 4.1: Effekte von Ischämie und Reperfusion auf den links ventrikulär entwickelten Druck (LVDP). Die Herzen wurden einer Ischämie von 45 min ausgesetzt und anschließend für 120 min reperfundiert (I/R). Während der Reperfusion wurden sie mit Isoprenalin (ISO, 10 nM) von der 30. bis zur 40. min oder mit Difluormethylornithin (DFMO, 10 μ M) von der 25. bis zur 40. min perfundiert. Nx (helle Balken) symbolisiert vier identische Gruppen von normoxen Herzen, die im Unterschied zu den dunklen Balken nicht einer 45 minütigen Ischämie ausgesetzt waren, ansonsten aber die gleiche Behandlung erfuhren.

A) LVDP vor Versuchsbeginn.

B) LVDP nach vollendeter Reperfusion.

Die gestrichelte Linie zeigt den durchschnittlichen LVDP der normoxischen Kontrollgruppe ohne Intervention. Die Daten sind angegeben als box-and-whiskers plots. Für alle Gruppen (n=8). $p < 0.05$ vs. Nx ; #, $p < 0.05$ vs I/R.

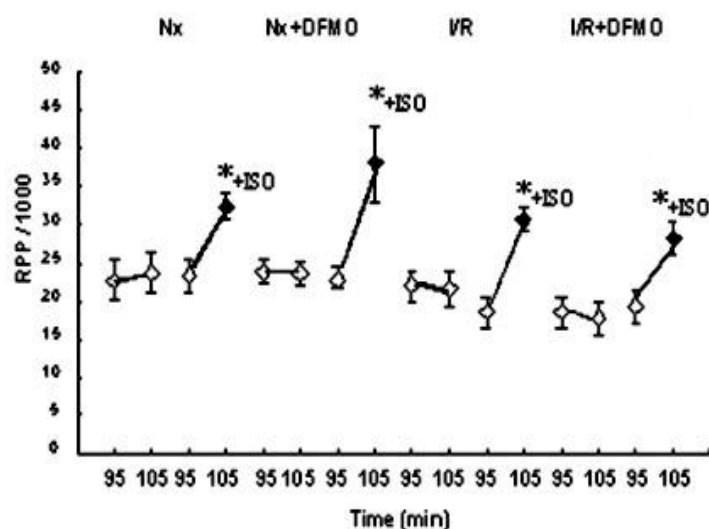


Abb. 4.2: Effekt von Isoprenalin (ISO, 10 nM, dunkle Symbole) auf das „rate pressure product“ (RPP). Nach einer 20 minütigen Stabilisierungsphase folgte für 45 min ein Perfusionsstop. Nach 30 min Reperfusion wurden die Herzen mit Isoprenalin unter normoxen Bedingungen (Nx), unter Hemmung der ODC (Nx+DFMO) sowie unter Ischämie und Reperfusion (I/R) mit Hemmung der ODC (I/R+DFMO) stimuliert. Die Daten sind ausgedrückt als box-and-whiskers-plots (n=8). *, $p < 0.05$ vs. Nx.

4.2 Auswirkung von Aktivierung und Inhibierung der ODC auf die Expression hypertrophie- und apoptose-assoziiierter Gene des linken Ventrikels

Anschließend wurde die Expression der ODC nach einer post-ischämischen Reperfusion und nach Zugabe von Isoprenalin bestimmt. Des weiteren wurde untersucht inwieweit DFMO diese Effekte beeinflusst. Die Stimulation durch Isoprenalin bewirkte in normoxisch perfundierten Herzen eine Zunahme der Expression von ODC mRNA (siehe Abb. 4.3). Diese Heraufregulierung der mRNA Synthese konnte durch das Vorhandensein von DFMO abgeschwächt werden (siehe Abb. 4.3). Dies führt zu der Annahme eines positiven feedback Mechanismus im normoxischen linken Ventrikel. Eine alleinige Ischämie mit anschließender Reperfusion konnte die Expression von ODC nicht modifizieren (siehe Abb. 4.3). Isoprenalin hingegen führte zu einer Induktion von ODC mRNA in den post-ischämischen Herzen. Überraschenderweise kam es zu einer Erhöhung der ODC mRNA Expression in den linken Ventrikeln, in denen ODC irreversibel während der Reperfusion durch DFMO inhibiert wurde (siehe Abb. 4.3). Diese Erkenntnis ließ den Schluss eines negativen feedback im post-ischämischen linken Ventrikel zu. Ausgehend von dieser Erkenntnis, wurde die Isoprenalinabhängige Hochregulation von ODC mRNA im post-ischämischen Herzen durch das Vorhandensein von DFMO nicht abgeschwächt. Dies ist ein ersichtlicher Unterschied zu den nicht-ischämischen Herzen, in denen eher ein positiver als ein negativer feedback Mechanismus zu beobachten war. Ausgehend von dieser Tatsache implizieren diese Daten einen signifikanten Unterschied in der Regulation der ODC mRNA Regulation in post-ischämischen Herzen im Vergleich zu nicht-ischämischen Herzen.

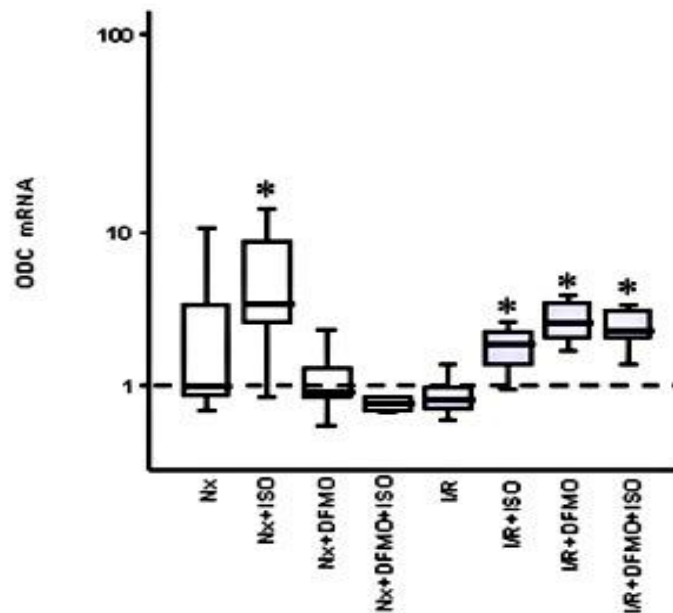


Abb. 4.3: Linksventrikuläre ODC mRNA Expression der 8 Versuchsgruppen. Die Daten sind dargestellt als box-and-whiskers-plots (n=8). *, $p < 0.05$ vs. Nx.

In der gleichen Versuchsreihe wurde ferner die mRNA Expression des pro-apoptotischen Gens bax sowie des anti-apoptotischen Gens bcl-2 bestimmt. Hierbei wurden keine Unterschiede in der Expression der bax mRNA in den nicht-ischämischen Herzen registriert (siehe Abb. 4.4A). Eine alleinige Ischämie mit anschließender Reperfusion führte zu einer signifikanten Runterregulation von bax. Dieser Effekt wurde aufgehoben in den Herzen, die einer vorübergehenden β -Adrenozeptor Stimulation durch Isoprenalin ausgesetzt wurden (siehe Abb. 4.4A). Eine Blockierung der ODC durch DFMO ergab keine Veränderung bezüglich der bax mRNA Expression bei Ischämie und Reperfusion (siehe Abb. 4.4A).

Isoprenalin konnte jedoch unter gleichzeitiger DFMO Perfusion die bax mRNA Expression nicht normalisieren (siehe Abb. 4.4A). Dies suggeriert die Annahme, dass die Isoprenalinvermittelte Heraufregulation im post-ischämischen Myokard ODC abhängig abläuft. In Bezug auf bcl-2, ein anti-apoptotischer Agonist, ist zu konstatieren, dass Isoprenalin die mRNA Expression in normoxischen Herzen erhöht. Diese Auswirkung konnte durch die Zugabe von DFMO abgeschwächt werden (siehe Abb. 4.4B). Außerdem erhöhte Isoprenalin die Expression der bcl-2 mRNA stark im post-ischämischen Herzen. Dieser evozierte Effekt war ausgeprägter als in den normoxischen Herzen. Auch hier schwächt DFMO den Effekt ab (siehe Abb. 4.4B).

Schließlich wurden in diesen Herzen noch die Veränderungen der Expression der ANF mRNA untersucht. Hierbei erhöhte Isoprenalin die Expression der ANF mRNA in den normoxischen Herzen. Auch hier konnte der abschwächende Effekt von DFMO verifiziert werden (siehe Abb. 4.5). Eine Ischämie mit nachfolgender Reperfusion führte zu einer Hochregulierung des ANF. Diese Auswirkung konnte weiter durch eine transiente Stimulation der β -Adrenorezeptoren gesteigert werden. Wie bereits bei den normoxischen Herzen festzustellen war, schwächte DFMO eine Zunahme der ANF mRNA Expression ab.

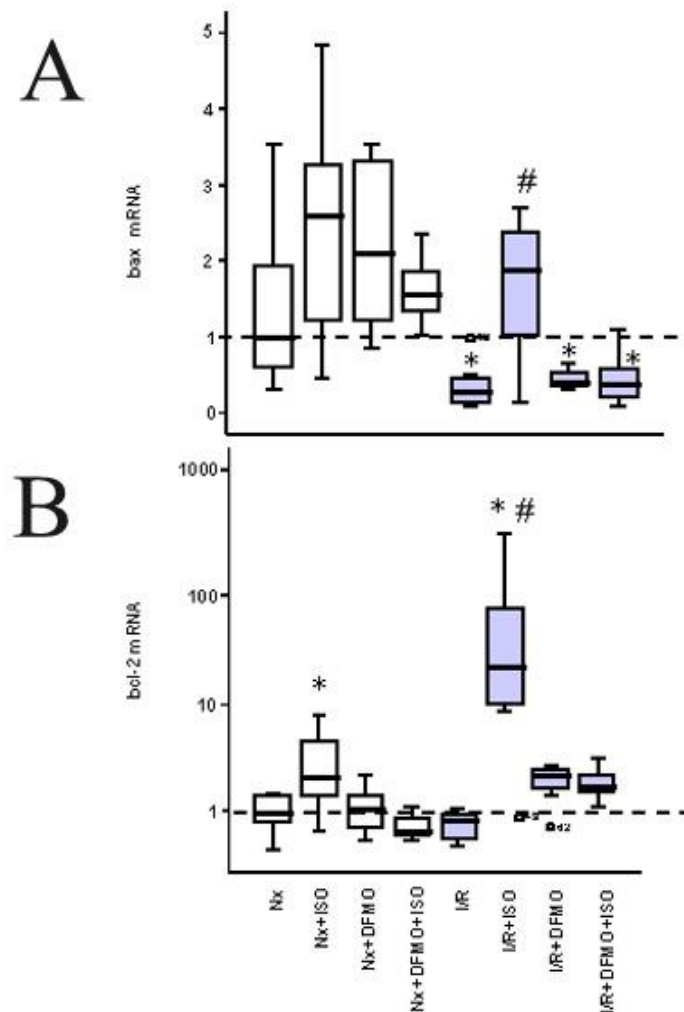


Abb. 4.4: Linksventrikuläre bax mRNA sowie bcl-2 mRNA Expression der 8 Versuchsgruppen. Die Daten sind dargestellt als box-and-whiskers-plots (n=8). *, p<0.05 vs. Nx; #, p<0.05 vs. I/R.

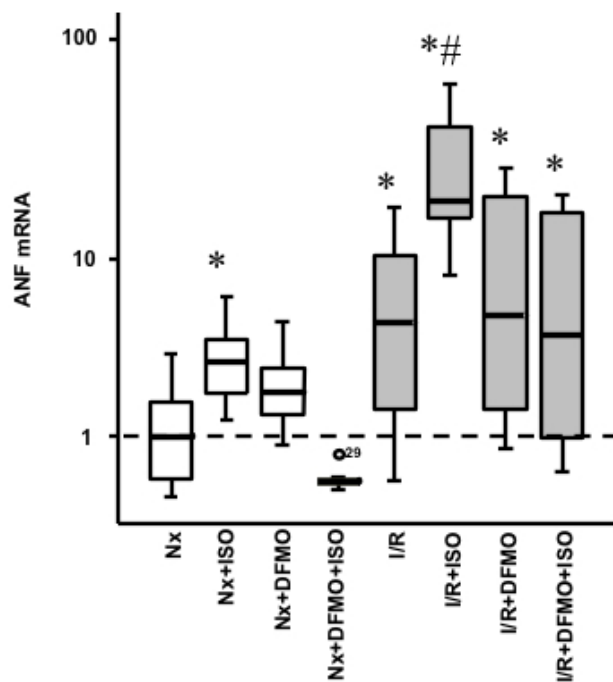


Abb. 4.5: Linksventrikuläre ANF mRNA Expression der 8 Versuchsgruppen. Die Daten sind ausgedrückt als box-and-whiskers-plots (n=8). *, $p < 0.05$ vs. Nx.

4.3 Auswirkung von Aktivierung und Inhibierung der ODC auf die Expression hypertrophie- und apoptose-assoziiierter Gene des rechten Ventrikels

Im rechten Ventrikel wurde die ODC mRNA Expression durch Isoprenalin nicht aktiviert, wohingegen DFMO ihre basale Expression reduzierte (siehe Abb. 4.6). Aus diesem Grund wurde der positive feedback Mechanismus, der bereits im linken Ventrikel unter normoxischen Bedingungen gezeigt wurde, auch im rechten Ventrikel bestätigt. In Bezug auf den rechten postischämischen Ventrikel der Herzen gab es keine signifikanten Veränderungen in der ODC mRNA Expression (siehe Abb. 4.6). Daraus folgt, dass ein positiver feedback Mechanismus weder im post-ischämisch rechten noch im post-ischämisch linken Ventrikel nachgewiesen werden konnte.

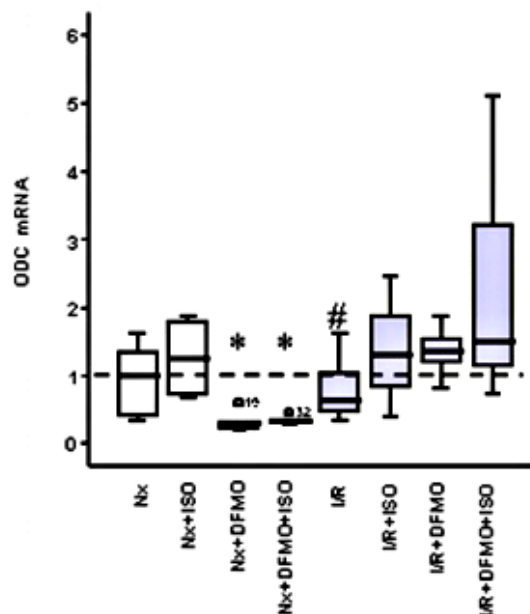


Abb. 4.6: Rechtsventrikuläre ODC mRNA Expression der Herzen der 8 Versuchsgruppen. Die Daten sind ausgedrückt als box-and-whiskers-plots (n=8). *, p<0.05 vs. Nx.

Es wurde eine leichte Zunahme der bax mRNA Expression im rechten Ventrikel durch Isoprenalin induziert. Die Auswirkung war jedoch stärker bei gleichzeitigem Vorhandensein von DFMO (siehe Abb. 4.7A). Im rechten Ventrikel der Herzen, die einer Ischämie und Reperfusion

ausgesetzt wurden, erhöhte Isoprenalin die bax mRNA Expression signifikant. Dadurch, dass dieser Effekt durch DFMO inhibiert werden konnte, wurde eine ODC Abhängigkeit gefolgert. Die Auswirkungen durch Isoprenalin in Bezug auf die bcl-2 mRNA Expression war im Vergleich zur bax mRNA Expression sehr viel stärker. Isoprenalin verursachte eine Hochregulierung von bcl-2 in Abwesenheit von DFMO (siehe Abb. 4.7B). Ferner konnte die bcl-2 mRNA Expression im rechten Ventrikel erhöht werden, deren Herzen einer Ischämie und folgender Reperfusion ausgesetzt waren (siehe Abb. 4.7B). Dieser Effekt wurde nicht verändert durch die Aktivierung oder Inhibierung der ODC (siehe Abb. 4.7B).

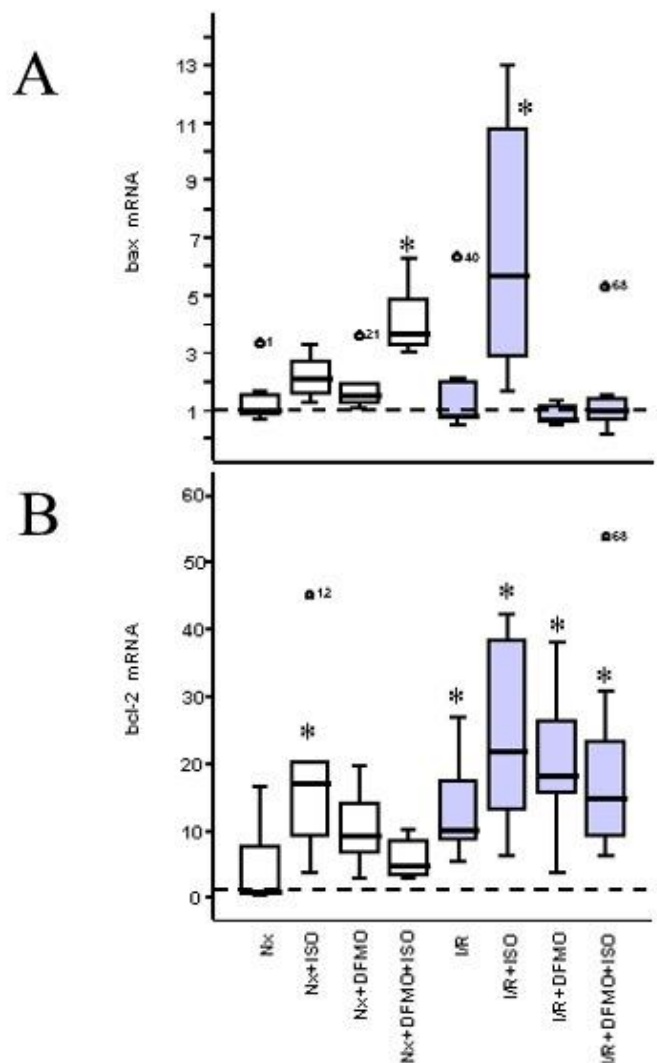


Abb. 4.7: Rechtsventrikuläre bax mRNA und bcl-2 mRNA Expression der 8 Versuchsgruppen. Die Daten sind ausgedrückt als box-and-whiskers-plots (n=8). *, $p < 0.05$ vs. Nx; #, $p < 0.05$ vs. I/R.

Die ANF mRNA Expression war signifikant erhöht im rechten Ventrikel der normoxischen Herzen, die mit Isoprenalin behandelt wurden. DFMO konnte diesen Effekt abschwächen (siehe Abb. 4.8). Eine alleinige Ischämie zog eine Hochregulation von ANF mRNA im rechten Ventrikel nach sich, die nicht durch Stimulation oder Inhibierung der ODC modifiziert wurde.

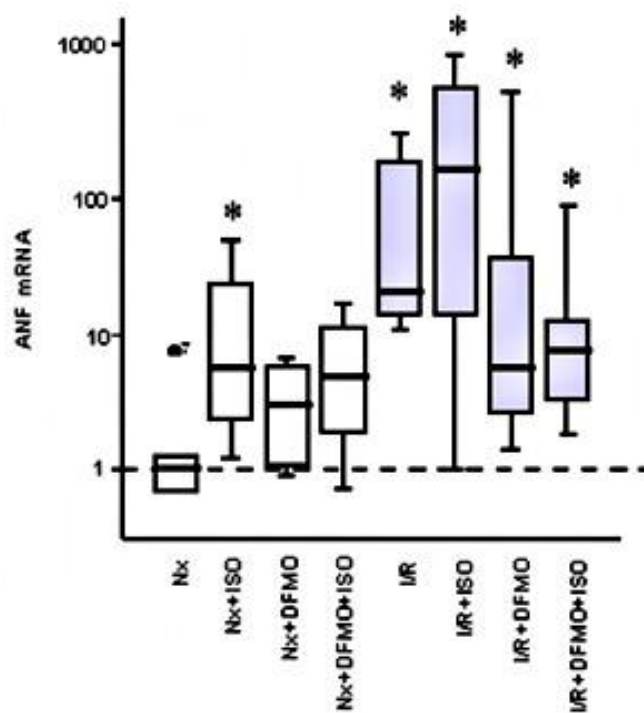


Abb. 4.8: Rechtsventrikuläre ANF mRNA Expression der Herzen der 8 Versuchsgruppen. Die Daten sind ausgedrückt als box-and-whiskers-plots (n=8). *, $p < 0.05$ vs. Nx.

5 Diskussion

5.1 Haupterkenntnisse

In dieser Studie wurde untersucht, ob die Induktion oder die Inhibierung des Polyaminstoffwechsels Auswirkungen auf das normoxische oder das post-ischämische Rattenherz hat. Es ergaben sich folgende Unterschiede zwischen dem normoxischen und dem post-ischämischen Rattenherzen in Bezug auf die Rolle des Polyaminstoffwechsels: Eine Inhibierung der ODC führte zu einer signifikanten Verschlechterung der Funktionserholung im post-ischämischen Herzen, wohingegen im normoxischen Herzen kein Effekt zu verifizieren war. Durch den nicht vorhandenen positiven feedback Mechanismus wurde die ODC m-RNA Expression im post-ischämischen Herzen erhöht. Des weiteren wurde das pro-apoptotische Gen bax in einem polyaminabhängigen Signalweg im post-ischämischen Herzen hochreguliert; nicht jedoch im normoxischen Herzen. Im Gegensatz dazu gab es aber auch Übereinstimmungen: Durch eine Stimulation der β -Adrenozeptoren ergab sich eine Veränderung in Richtung Hypertrophie, die durch unterschiedliche Expression der ANF und ODC m-RNA im linken Ventrikel manifest wurde. Außerdem erhöhte sich hier auch die bcl-2 Expression. Im Gegensatz zum linken Ventrikel war die pro-hypertrophische Antwort im rechten Ventrikel (ANF und bcl-2 Expression) weniger abhängig vom Polyaminstoffwechsel. Alles in allem suggerieren die in dieser Studie gewonnenen Daten Unterschiede im normoxen und postischämischen Herzen bezüglich des Polyaminstoffwechsels. Sie sprechen für ein Überwiegen von schützenden Effekten durch die Induktion des Polyaminstoffwechsels, speziell im linken Ventrikel, in Bezug auf Funktion und Expression.

5.2 Effekte der ODC auf das post-ischämische Recovery

Die Rolle der Polyamine in Bezug auf Ischämie und Reperfusion waren und sind Gegenstand zahlreicher Studien, die sich mit unterschiedlichen Geweben wie z.B. Hirn, Niere oder Herz befassen. In dem polyaminenen Biosyntheseweg ist die ODC das geschwindigkeitsbestimmende Enzym und wird durch ihre Expression reguliert (Tipnis et al., 2000). Die ODC ist in β -Adrenozeptor abhängige Hypertrophieprozesse des Herzen involviert (Shantz et al., 2001). Dies konnte sowohl in vivo als auch in vitro gezeigt werden. Nur wenige Erkenntnisse sind bis jetzt zur Beziehung zwischen der Aktivierung wie der ODC und des Polyaminstoffwechsels und zu deren Auswirkung auf die kardiale Kontraktilität erforscht. Eine Aktivität der ODC erhöht die positive Inotropie im linken isolierten Rattenvorhof. Putrescin stellt das primäre Produkt der ODC dar, welches weiter zu Spermidin bzw. Spermin verstoffwechselt wird. Spermine erhöht konzentrations-abhängig die intrazelluläre Ca^{2+} in Kardiomyozyten des isolierten Rattenventrikels (Wang et al., 2003). Diese Erkenntnis suggeriert einen positiv kontraktile Effekt, der durch Polyamine hervorgerufen wird. Darüber hinaus verbessert das vor einer Ischämie von außen zugeführte Spermin die Funktionserholung der post-ischämischen Herzen. In der vorliegenden Studie wurde die ODC Aktivität während der Reperfusion durch die Zugabe von DFMO blockiert. Dies führte anschließend zu einer Verschlechterung der Funktionserholung der Rattenherzen. Ausgehend von dieser Tatsache impliziert dies, dass die endogene Polyaminsynthese für die Funktionserholung des Herzens benötigt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die endogene Regulation der ODC mRNA vom nicht-ischämischen im Vergleich zum reperfundierten Rattenherzen nach Ischämie abweicht. Gleichzeitig stellte sich heraus, dass die Inhibierung der ODC zu einer Reduktion der post-ischämischen Funktionserholung führte, wohingegen sie unter normoxen Bedingungen nicht verändert wurde. Dieser Befund impliziert eine spezifische Rolle der ODC Aktivierung für die kardiale Funktion während der Reperfusion. Der grundlegende Mechanismus wurde in dieser Studie jedoch nicht weiter untersucht. In anderen Studien wurden allerdings Ideen diskutiert, dies auf einer molekularen Ebene zu erklären. Eine Möglichkeit geht davon aus, dass Polyamine eine Eisenakkumulation in Kardiomyozyten verhindern und es somit zu einer Abnahme freier Sauerstoffradikale kommt (Marzabadi et al., 1996). Ein anderer Erklärungsansatz sieht die

verbesserte Reperfusion darin begründet, dass es eine erhebliche Schnittfläche zwischen dem Polyaminmetabolismus einerseits und dem Stickstoffmonoxid (NO) Stoffwechsel andererseits gibt (Peranzoni et al., 2007). So führt eine Entleerung des kardialen Polyaminstoffwechsels, herbeigeführt durch die Blockierung der ODC, zu einer Erhöhung des NO Gehaltes (Zhao et al., 2007). Es ist bekannt, dass von außen zugeführtes NO das Leistungsvermögen im post-ischämischen Herzen sowie von Myozyten negativ beeinflusst. Unsere Beobachtung, dass eine Inhibierung der ODC während der Reperfusion die Funktionserholung verschlechtert, deckt sich mit den oben angestellten Überlegungen. Außerdem führt ein Mangel an Polyaminen zu einer schnellen Induktion von NF- κ B. Eine Aktivierung von NF- κ B steht ebenfalls in Zusammenhang mit einer reduzierten kardialen Kontraktilität.

5.3 Effekt der ODC auf Hypertrophie

Im reperfundierten Herzen ist eine frühe Aktivierung von Signalen zu beobachten, die mit myokardialer Hypertrophie assoziiert sind. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass Isoprenalin, ein β -Adrenozeptor Agonist, fähig ist die ODC innerhalb von zwei Stunden zu aktivieren (Schlüter et al., 2000). Diese Aktivierung hängt von der Induktion der ODC mRNA Expression ab. So kommt es bei einer Inhibition der ODC Aktivität zu einer abgeschwächten prohypertrophen Antwort auf Isoprenaline in vitro als auch in vivo (Schlüter et al., 2000; Flamigni et al., 1986). Die neue Studie bestätigte diese vorherigen Erkenntnisse im Langendorff perfundierten Rattenherzen. Auch hier verursachte Isoprenalin eine Induktion der ODC mRNA Expression und ging ferner einher mit einer Induktion von ANF, welches ein Marker für myokardiale Hypertrophie darstellt. ANF mRNA war bereits im rechten und linken Ventrikel nach Ischämie und Reperfusion erhöht. Mit diesen Resultaten geht einher, dass der ANF Promoter ein HIF-reguliertes Element enthält (Chun et al., 2003). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die bereits erhöhte ANF Expression im linken Ventrikel nach erfolgter Ischämie/Reperfusion, durch β -Adrenozeptor Stimulation weiter erhöht werden konnte. Dieser

Prozess war klar abhängig von der ODC Aktivität. Hiervon ausgehend kann geschlossen werden, dass die ODC Aktivierung einen pro-hypertrophen Effekt im normoxischen wie auch post-ischämischen Herzen nach sich zieht, unabhängig von den Unterschieden in der ODC Regulation.

5.4 Effekt der ODC auf Apoptose

Der Metabolismus biogener Amine spielt neben der oben beschriebenen myokardialen Hypertrophie auch eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Apoptose kann durch verschiedene Stressfaktoren induziert werden, was zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol führt. Cytochrom c aktiviert Caspase 9, die eine Schlüsselrolle als Initiator-Caspase einnimmt. Es kommt folglich zu einer proteolytischen Aktivierung nachgelagerter Proteasen, inklusive der Effektorcaspase 3 (Huang et al., 2005). Aus diesem Grund ist die Regulation der Freisetzung von Cytochrom c ein entscheidender Schritt in der Steuerung der zellulären Apoptose. Dieser Prozess ist u.a. kontrolliert durch bcl-2, welches die mitochondriale Cytochrom c Ausschüttung blockiert, sowie bax, welches das Freisetzen begünstigt. Pro- und antiapoptotische Signalwege modifizieren die Expression von bcl-2 oder bax m-RNA. In dieser vorliegenden Studie wurde der Effekt der ODC Aktivierung auf die Expression von bcl-2 und bax mRNA untersucht. Tantini et al. (2006) haben vor kurzem gezeigt, dass Polyamine in der Apoptose ischämischer kardialer Zellen involviert sind. Es wurde konstatiert, dass eine Aktivierung der ODC zu einer Hochregulierung von bax in Herzen führt, die einer stimulierten Ischämie ausgesetzt waren, was nicht unter normoxischen Bedingungen der Fall war. In dieser Studie ist es gelungen diese Ergebnisse im Langendorff-Modell mit Hilfe von adulten Rattenherzen anstelle von H9c2 Zellen zu verifizieren. Isoprenaline induzierte die Expression von bax mRNA im linken und rechten Ventrikel post-ischämischer Herzen, was unter normoxisch perfundierten Herzen nicht der Fall war. Dieser Effekt des Isoprenaline auf die bax Expression im post-ischämischen Herzen konnte durch DFMO inhibiert werden, was auf einen polyaminabhängigen Signaltransduktionsweg schließen lässt. Es konnte jedoch ein sehr viel

stärkerer Effekt auf Isoprenalin bei dem Gegenspieler bcl-2 gezeigt werden. Die Resultate dieser Studie unterstützen nicht die These, dass Polyamine die Apoptose im post-ischämischen Herzen begünstigen, obwohl die Apoptose nicht direkt gemessen wurde. Diese Erkenntnis der vorliegenden Studie geht einher mit zwei weiteren Studien. Erstens konnte in einer vorhergehenden Studie dargestellt werden, dass das postischämische Rattenherz gegenüber apoptotischer Stimulation weniger ansprechbar ist als das normoxische Herz (Taimor et al., 2000). Zweitens inhibierten Polyamine wie Spermin und Spermidin signifikant die Apoptose neonataler Rattenkardiomyozyten, die einer simulierten Ischämie ausgesetzt wurden (Ryu et al., 2008). Die Polyamine unterdrückten hierbei die Aktivierung der Caspase-3 sowie -9 und erhöhten die Expression von bcl-2. Erwähnenswert ist hier jedoch der gegenteilige Effekt, der bei Putrescine beobachtet wurde, was für verschiedene Effekte dieser Polyamine spricht. Die Ergebnisse dieser Studie jedoch begünstigen die Annahme einer eher pro-hypertrophischen als pro-apoptotischen Antwort auf β -Adrenozeptor Stimulation im post-ischämischen Herzen. Als Fazit dieser Studie zeigt die induzierte Aktivierung des Polyaminstoffwechsels pro- und anti-apoptotische Signalwege mit einem stärkeren Effekt des Zweiten. Eine mögliche Erklärung könnte durch die verschiedenen Effekte von Putrescine im Vergleich zu Spermin und Spermidin gegeben werden.

5.5 Unterschiede zwischen rechtem und linkem Ventrikel

Diese Studie, als eine der Ersten, untersuchte den Polyaminstoffwechsel im normoxischen und post-ischämischen rechten Ventrikel im Vergleich zum linken Ventrikel. Unterschiede zwischen beiden Ventrikel in dem Verhalten auf chronische Drucküberlastung konnten bereits in der Vergangenheit festgestellt werden (Matsubara et al., 2006). Die jeweilige Reaktion des rechten im Vergleich zum linken Ventrikels auf eine Ischämie mit nachgeschalteter Reperfusion benötigt jedoch noch weitere Studien. In der hier vorliegenden Studie konnten keine Gegensätze beider Ventrikel in der Expression der ODC beobachtet werden. Es konnte herausgefunden werden, dass die

Stimulation mit Isoprenaline eine Hochregulation der Expression von bcl-2 und ANF mRNA im post-ischämischen linken und rechten Ventrikel zur Folge hatte. Hierbei bestand der Hauptunterschied darin, dass die blockierende Wirkung von DFMO nur im linken Ventrikel stattfand. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer Umstrukturierung der Isoprenaline abhängigen pro-hypertrophen Antwort im post-ischämischen rechten Ventrikel kommt, welche so nicht im linken Ventrikel eintritt.

5.6 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann man konstatieren, dass Polyamine neben der bekannten neuroprotektiven Funktion, auch eine kardioprotektive Wirkung besitzen, was in dieser und anderen Studien, die den Effekt der Polyamine auf die post-ischämische Funktionserholung untersuchen, belegt werden konnte. Dies manifestiert sich in direkten Auswirkungen auf die kardiale Kontraktilität und somit auf die reduzierte Funktionserholung in Herzen, in denen die Polyaminlevel verringert sind. Außerdem zeigt sich der kardioprotektive Effekt in der Induktion myokardialer Hypertrophie und nicht in Apoptose im post-ischämischen Herzen, obgleich pro-apoptotische Signalwege zu einem gewissen Grad aktiviert werden. Dadurch dass der hypertrophe Effekt eine β -adrenozeptor abhängige Induktion der ODC voraussetzt, kam es zu post-ischämischen Funktionsveränderungen unter Inhibierung der ODC durch DFMO. Aus diesem Grund erschien es ersichtlich, dass der basale Polyamingehalt die Inotropie modifiziert, nicht jedoch die pro- und anti-apoptotischen Signalwege.

6 Zusammenfassung

Die Unterbrechung des koronaren Blutflusses führt zum Myokardinfarkt. Die am erfolgreichsten durchzuführende Intervention stellt die frühzeitige Reperfusion von Blut dar. So kann es zu einem Überleben der Zellen und einer Funktionserhöhung kommen. Trotz der erneuten Perfusion und dem Überleben des Myokards, welches durch Kontraktionsaktivität gemessen werden kann, kommt es zu neuem Stress: Der sogenannte Reperfusionstress. Dieser ist charakterisiert durch ein Missverhältnis von Ionen, z.B. einer Anhäufung von H^+ und Ca^{2+} , sowie einer Neuregulation zellulärer Gene wie z.B. das pro-apoptotische Gen bax und das anti-apoptotische bcl-2. Diese Prozesse führen u.a. zu hypertrophem Wachstum und myokardialer Fibrose und werden als Remodeling bezeichnet. Es ist bekannt, dass Polyamine in der Funktionserhöhung des post-ischämischen Herzens eine wichtige Rolle einnehmen.

Die Aufgabe dieser Studie bestand darin, den Effekt einer Aktivierung und Inhibierung der Ornithinedecarboxylase (ODC), welche das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Polyaminbiosynthese darstellt, bezogen auf die Funktionserhöhung sowie die frühe Induktion von Apoptose oder hypertrophem Wachstum in Kardiomyozyten zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden Rattenherzen einer 45 minütigen Nullfluss-Ischämie mit anschließender 120 minütiger Reperfusion unterzogen. Die Kontrollen wurden für 165 min konstant unter normoxen Bedingungen perfundiert. Die ODC wurde durch die 10 minütige Zugabe von Isoprenalin (10nM), 30 min nach erfolgter Reperfusion aktiviert und durch Difluoromethylornithin (DFMO) inhibiert. Als Funktion des Herzens wurde der linksventrikulär entwickelte Druck angenommen. (LVDP). Die Expression der ODC, bcl-2, bax sowie ANF beider Ventrikel wurde durch die real-time-PCR nach 120 min erfolgter Reperfusion bestimmt.

Diese Studie konnte verifizieren, dass die Inhibition der ODC Aktivität die Funktionserhöhung der ischämisch-reperfundierten Herzen verschlechterte, wohingegen sich bei den normoxisch perfundierten Herzen keine Änderungen zeigten. Die Induktion der ODC hatte keinen Effekt auf die Funktionserhöhung. Obwohl es zu einer Steigerung der Expression des pro-apoptotischen

Gens bax im post-ischämischen Herzen kam (nicht bei den normoxen Herzen), überwog die anti-apoptotische Genexpression durch bcl-2. Darüberhinaus führte die Induktion der ODC zu einer Zunahme von ANF unter post-ischämischen Bedingungen. Diese Ergebnisse zeigten sich in beiden Ventrikeln, wohingegen die Induktion von bcl-2 und ANF im rechten Ventrikel weniger von der ODC Aktivierung abhängig war. Die Resultate dieser Studie belegen den vielversprechenden Ansatz neuer protektiver Strategien des post-ischämischen Herzens, wie den hier untersuchten Einfluss des Polyaminstoffwechsels. Diese Erkenntnisse könnten für neue Wege in der Kardiologie oder Herzchirurgie sorgen.

7 Summary

Interruption of coronary perfusion results in myocardial infarction. The early reperfusion of blood flow is the most successful intervention leading to cell survival and functional recovery.

However, in spite of the restoration of blood flow and thus the myocardial survival, which is measurable by its contractile activity, the heart is confronted by new stress: The so-called reperfusion injury. This is characterized by a cytosolic disproportion of ions like an accumulation of H^+ or Ca^{2+} and a change concerning the regulation of cellular genes such as the pro-apoptotic gene bax or anti-apoptotic gene bcl-2. These conditions lead among other things to hypertrophic growth and myocardial fibrosis which is termed remodeling. Polyamines are known to play an important role in the functional recovery of the post-ischemic heart.

The aim of this study was to investigate the effect of an activation or inhibition of ornithine decarboxylase (ODC), which is the rate-limiting enzyme for polyamines, on the functional recovery and the early induction of apoptotic or hypertrophic pathways in rat cardiomyocytes. For this reason rat hearts were exposed to 45 min no-flow ischemia and 120 min reperfusion, whereas controls were constantly perfused for 165 min under normoxic conditions. ODC was activated by application of isoprenaline (10nM), starting 30 min after the onset of reperfusion and lasting for 10 min, and inhibited by application of difluoromethyl ornithine (DFMO). The heart function was determined as left ventricular developed pressure (LVDP). The expression of ODC, bcl-2, bax and ANF were measured by real time RT-PCR in both ventricles at the end of 120 min reperfusion.

This study could verify that inhibition of ODC activity worsened the functional recovery of the ischemia-reperfused hearts but did not modify basal function of normoxic perfused hearts. Induction of ODC had no effect on the functional recovery. Although it induced the expression of the pro-apoptotic gene bax in post-ischemic hearts (not in normoxic hearts) the anti-apoptotic gene expression of bcl-2 was leading. Furthermore the induction of ODC led to an increase of ANF in post-ischemic conditions. These findings could be demonstrated in both ventricles,

whereas the induction of bcl-2 and ANF was less dependent on ODC activation in the right ventricle. The results of this study shows that taking influence of polyamine metabolism is a promising approach concerning new protective strategies for the post-ischemic heart. These findings could modify new approaches in cardiology or in cardiac surgery.

8 Literaturverzeichnis

Ackermann JM, Pegg AE, Mc Closkey DE,
Drugs affecting the cell cycle via actions on the polyamine metabolic pathway.
Prog Cell Cycle Res. 2003;5:461-468

Bartolome J, Huguenard J, Slotkin TA.
Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy.
Science. 1980 Nov 14;210(4471):793-4.

Bonavita F, Stefanelli C, Giordano E, Columbaro M, Facchini A, Bonafè F, Caldarera CM,
Guarnieri C.
H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum
deprivation and hypoxia: inhibition by PMA.
FEBS Lett. 2003 Feb 11;536(1-3):85-91.

Bowers KC, Allshire AP, Cobbold PH.
Bioluminescent measurement in single cardiomyocytes of sudden cytosolic ATP depletion
coincident with rigor.
J Mol Cell Cardiol. 1992 Mar;24(3):213-8

Chun YS, Hyun JY, Kwak YG, Kim IS, Kim CH, Choi E, Kim MS, Park JW.
Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect
actions of hypoxia-inducible factor-1.
Biochem J. 2003 Feb 15;370(Pt 1):149-57.

Coffino P.
Regulation of cellular polyamines by antizyme.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Mar; 2(3):188-94. Review

Döring H.J., Dehnert H.

Das isolierte perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff.

1. Auflage 1985, Biomesstechnik-Verlag March, 1-120

Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevendans PA.

Role of apoptosis in reperfusion injury.

Cardiovasc Res. 2004 Feb 15;61(3):414-26.

Flamigni F, Rossoni C, Stefanelli C, Caldarera CM.

Polyamine metabolism and function in the heart.

J Mol Cell Cardiol. 1986 Jan;18(1):3-11. Review.

Fyhrquist F, Sirviö ML, Helin K, Saijonmaa O, Metsärinne K, Paakkari I, Järvinen A, Tikkanen I.

Endothelin antiserum decreases volume-stimulated and basal plasma concentration of atrial natriuretic peptide.

Circulation. 1993 Sep;88(3):1172-6.

García-Dorado D.

Myocardial reperfusion injury: a new view.

Cardiovasc Res. 2004 Feb 15;61(3):363-4.

Grohé C, van Eickels M, Wenzel S, Meyer R, Degenhardt H, Doevendans PA, Heinemann MP, Ross G, Schlüter KD.

Sex-specific differences in ventricular expression and function of parathyroid hormone-related peptide.

Cardiovasc Res. 2004 Feb 1;61(2):307-16.

Han B, Hasin Y.

Cardiovascular effects of natriuretic peptides and their interrelation with endothelin-1.

Cardiovasc Drugs Ther. 2003 Jan;17(1):41-52.

Han L, Xu C, Jiang C, Li H, Zhang W, Zhao Y, Zhang L, Zhang Y, Zhao W, Yang B.

Effects of polyamines on apoptosis induced by simulated ischemia/reperfusion injury in cultured neonatal rat cardiomyocytes.

Cell Biol Int. 2007 Nov;31(11):1345-52. Epub 2007 May 29.

Herold G.

Innere Medizin

Gerd Herold, Köln 2007; 220-221

Huang CC, Hsu PC, Hung YC, Liao YF, Liu CC, Hour CT, Kao MC, Tsay GJ, Hung HC, Liu GY.

Ornithine decarboxylase prevents methotrexate-induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production.

Apoptosis. 2005 Aug;10(4):895-907

Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P.

Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats.

Am J Physiol. 1996 Sep;271(3 Pt 2):H1215-28.

Lee LG, Connell CR, Bloch W.

Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.

Nucleic Acids Res. 1993 Aug 11;21(16):3761-6.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K.

Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.

PCR Methods Appl. 1995 Jun;4(6):357-62.

Loennechen JP, Støylen A, Beisvag V, Wisløff U, Ellingsen O.

Regional expression of endothelin-1, ANP, IGF-1, and LV wall stress in the infarcted rat heart.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Jun;280(6):H2902-10.

Marzabadi MR, Låvaas E

Spermine prevent iron accumulation and depress lipofuscin accumulation in cultured myocardial cells.

Free Radic Biol Med. 1996;21(3):375-81.

Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SA, Zornoff LM, Matsubara BB.

Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart.

Arq Bras Cardiol. 2006 Feb;86(2):126-30. Epub 2006 Feb 20. Portuguese.

Nuutinen EM, Nishiki K, Erecińska M, Wilson DF.

Role of mitochondrial oxidative phosphorylation in regulation of coronary blood flow.

Am J Physiol. 1982 Aug;243(2):H159-69.

Oliveira PJ, Rolo AP, Palmeira CM, Moreno AJ.

Carvedilol reduces mitochondrial damage induced by hypoxanthine/xanthine oxidase: relevance to hypoxia/reoxygenation injury.

Cardiovasc Toxicol. 2001;1(3):205-13.

Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS.

Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. Experimental Working Group.

Circulation. 1996 Jul 1;94(1):10-3.

Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, Mantelli B, Bronte V, Zanovello P.

Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology.

Immunobiology. 2007;212(9-10):795-812. Epub 2007 Nov 14.

Pfaffl MW.

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.

Qi X, Wang L, Du F.

Novel Small Molecules Relieve Prothymosin alpha-Mediated Inhibition of Apoptosome Formation by Blocking Its Interaction with Apaf-1.

Biochemistry. 2010 Feb 1.

Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA.

Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill.

J Mol Cell Cardiol. 2003 Jun;35(6):559-67.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT.

Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.

Anal Biochem. 1997 Feb 15;245(2):154-60.

Rudin CM, Thompson CB.

Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death.

Annu Rev Med. 1997;48:267-81. Review.

Ryu JH, Cho YS, Chun YS, Park JW.

Myocardial SSAT induction via AMPK signalling and its implication for ischemic injury.

Biochem Biophys Res Commun. 2008 Feb 8;366(2):438-44. Epub 2007 Dec 4.

Schlüter KD, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Taimor G, Piper HM.

Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy.

Cardiovasc Res. 2000 Jan 14;45(2):410-7

Simoons ML, Windecker S.

Controversies in Cardiovascular Medicine Chronic stable coronary artery disease: drugs vs. revascularization

Eur Heart J. 2010 Jan 26 (Epub ahead of print)

Shantz LM, Feitj DJ, Pegg AE.

Targeted overexpression of ornithine decarboxylase enhances beta-adrenergic agonist-induced cardiac hypertrophy.

Biochem J. 2001 Aug 15;358(Pt 1):25-32

Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AG, Carnio EC, Branco LG, Albuquerque-Araujo WI, de Nucci G, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J.

Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):278-83.

Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM.

Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia.

Cardiovasc Res. 2000 Feb;45(3):588-94

Tantini B, Fiumana E, Cetrullo S, Pignatti C, Bonavita F, Shantz LM, Giordano E, Muscari C, Flamini F, Guarnieri C, Stefanelli C, Caldera CM.

Involvement of polyamines in apoptosis of cardiac myoblasts in a model of simulated ischemia.

J Mol Cell Cardiol. 2006 Jun;40(6):775-82. Epub 2006 May 5.

Tipnis UR, He GY, Li S, Campbell G, Boor PJ.

Attenuation of isoproterenol-mediated myocardial injury in rat by an inhibitor of polyamine synthesis.

Cardiovasc Pathol. 2000 Sep-Oct;9(5):273-80.

Thomas T, Thomas TJ.

Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications.

Cell Mol Life Sci. 2001 Feb;58(2):244-58. Review.

Wang R, Xu C, Zhao W, Zhang J, Cao K, Yang B, Wu L.

Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues.

Eur J Biochem. 2003 Jun;270(12):2680-8.

Yuan Q, Ray RM, Johnson LR.

Polyamine depletion prevents camptothecin-induced apoptosis by inhibiting the release of cytochrome c.

Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Jun;282(6):C1290-7.

Zhao YJ, Xu CQ, Zhang WH, Zhang L, Bian SL, Huang Q, Sun HL, Li QF, Zhang YQ, Tian Y, Wang R, Yang BF, Li WM.

Role of polyamines in myocardial ischemia/reperfusion injury and their interactions with nitric oxide.

Eur J Pharmacol. 2007 May 21;562(3) :236-46. Epub 2007 Feb 21.

9 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Christian Mörlein

10 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter bedanken, für die Bereitstellung des Themas, das engagierte Begleiten sowie die Unterstützung meiner Arbeit.

Sehr herzlich möchte ich mich ferner bei Herrn Dr. R. Schreckenberg bedanken für seine ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft, was viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ausserdem möchte ich Frau N. Wojtaski danken, die mir insbesondere bei methodischen Fragen zur Seite stand.

Ein großer Dank geht auch an die wissenschaftlichen Mitarbeiter des Institutes, welche mir durch Ihre Aufgeschlossenheit weitergeholfen haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

12 Abstracts

“The ODC/polyamine system is involved in cardiac remodeling“

C. Mörlein, R. Schreckenberger, K.-D. Schlüter

Vortrag bei der 86ten Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft,

25. – 28. März 2007, Hannover

Acta Physiologica 189 (Suppl. 653) : 61

“Ischemic post-conditioning attenuates the pro-hypertrophic effect of beta-adrenoceptors in the post-ischemic heart”

R. Schreckenberger, C. Mörlein, K.-D. Schlüter

Vortrag bei der 86ten Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft,

25. – 28. März 2007, Hannover

Acta Physiologica 189 (Suppl. 653) : 61

“Ischemic post-conditioning and its effect on beta-adrenoceptor responsiveness”

R. Schreckenberger, C. Mörlein, K.-D. Schlüter

Poster Session bei der 87ten Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft,

2. – 5. März 2008, Köln

“Basal Ornithine Decarboxylase Activity Modifies Apoptotic and Hypertrophic Marker Expression in Post-Ischemic Hearts”

C. Mörlein, R. Schreckenberger, K.-D. Schlüter

Open Heart Failure Journal, März 2010

